

ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

De l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

Discipline : Biologie des organismes

École Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés, Agronomie-Environnement (BSIAE)

Présentée et soutenue publiquement

Par

Youssef ABU AHMAD

Le 22 septembre 2006

Titre :

Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène du *Sugarcane yellow leaf virus*, agent causal de la feuille jaune de la canne à sucre

JURY

M. Jean-Loup NOTTEGHEM
Mme Véronique BRAULT
M. Olivier LEGALL
M. Emmanuel JACQUOT
M. Philippe ROTT

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Avant propos

Tout d'abord, je tiens à préciser que c'est avec beaucoup de reconnaissance et une émotion certaine que j'ai tracé ce parcours de thèse avec des travaux de recherche, des collaborations et des découvertes au sein du Cirad à Montpellier, à la Réunion et en Guadeloupe, ainsi que de l'UMR BGPI à Montpellier.

En premier lieu, c'est grâce à Philippe ROTT, mon directeur de thèse, que je me suis lancé dans cette grande aventure. Je le remercie très particulièrement de m'avoir proposé, d'avoir encadré et laissé développer ce sujet de cette thèse qu'il m'a confié vers des zones inexplorées, mais aussi pour sa bonne humeur et sa gentillesse, la pertinence de ses réflexions, sa rigueur scientifique et professionnelle, ainsi que pour son optimisme, sa passion, sa détermination et le courage et la grande disponibilité dont il a fait part pendant la rédaction et les heures passées à lire et relire ce manuscrit, et bien d'autres.

Je tiens également à remercier Monique ROYER pour son accueil au sein du laboratoire de bactériologie moléculaire et le développement, avec acharnement, de la biologie moléculaire et évolutive du SCYLV, ainsi que pour son soutien et sa disponibilité tout au long de ce travail. Un grand merci est adressé à Jean-Claude GIRARD pour son accueil au sein de l'équipe « Quarantaine », pour ses conseils, son aide au repérage des fautes à la lecture de nombreux manuscrits, ainsi que pour le partage de son savoir, son soutien et ses encouragements tout au long de ma thèse. Un grand merci également à Benoît MOURY qui a accepté de me faire partager son expérience de l'étude de l'évolution des virus, ainsi que pour ses conseils enrichissants et utiles.

Je remercie Jean-Heinrich DAUGROIS et Laurent COSTET pour leur accueil en Guadeloupe et à La Réunion, et de m'avoir permis de réaliser des expériences uniques à ce jour.

Mes remerciements s'adressent aux membres de jury : Madame Véronique BRAULT, Monsieur Olivier LE GALL, Monsieur Jean-Loup NOTTEGHEM et Monsieur Emmanuel JACQUOT qui ont accepté d'évaluer et de juger le travail présenté dans ce manuscrit.

Je remercie Olivier LEMAIRE, Michel PETERSCHMITT, Hervé LECOQ et Ben LOCKHART qui ont participé aux réunions de mon comité de thèse et qui m'ont permis d'élargir ma vision de la virologie végétale. Merci aussi à Gérard LABONNE, Jean-Michel LETT, Samuel NIBOUCHE et Nicolas SAUVION pour leurs conseils, les nombreuses discussions et la mise en place des méthodes d'élevage des pucerons.

Je remercie très chaleureusement les membres de l'équipe « Quarantaine canne à sucre » de Montpellier, Michèle CHATENET, Marie-Josée DARROUSSAT, Jean-François BOUSQUET, Emmanuel FERNANDEZ, Rémy HABAS et Marc MULLER, pour la grande sympathie qu'ils m'ont témoignée et leur aide précieuse à la réalisation des essais de phytopathologie, pour les bons moments passés ensemble, les sorties de ski dans les Pyrénées, les matchs de volley, les escalades de l'Hortus et du Pic Saint-Loup!

Merci aussi à Philippe LETOURMY pour ses précieux conseils concernant la mise en place des essais expérimentaux et l'analyse statistique des données. Je remercie également les membres de l'UMR BGPI, permanents ou de passage, pour les échanges scientifiques et amicaux durant cette thèse. Un grand merci notamment à Marie-Line CARUANA, Emmanuelle MULLER, Véronique MARIE-JEANE, Stéphane BLANC et Rémy FROISSART pour leur sympathie et leurs bons et précieux conseils en virologie, ainsi qu'à Daniel GARGANI pour les heures passées sous le microscope électronique et à la purification du SCYLV.

Un énorme merci à Philippe GAYRAL pour sa très grande patience dans mon apprentissage au fonctionnement du logiciel PAML.

Je tiens à remercier Robert DOMAINGUE et Jean-Loup NOTTEGHEM de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leurs unités, ainsi que leur suivi scientifique et administratif.

Mes remerciements s'adressent aussi à Rosiane BOISNE-NOC, Sandrine DUPLAN, Nathalie LABOUREAU, Magali PAYET, Isabelle PIERETTI et Steeve JOSEPH pour leur aide précieuse au laboratoire, pour leur bonne humeur et leur amitié.

Je n'oublierai pas de remercier Florence BARTHOD, Geneviève BOURELLY, Janine CAMMAL, Dominique HERAULT, Dominique LAGRENEE, Marie-Ange ROGER et Catherine REMONDAT pour leur support administratif, leur bonne humeur et leur amitié.

Ma liste est très longue et non exhaustive, mais je pense aussi à tous ceux qui n'ont pas été cités ci-dessus. Pour ne pas faire de jaloux je ne citerai aucun nom mais ils vont certainement se reconnaître. Qu'ils sachent que je les remercie du fond du cœur.

Un chaleureux merci à tous les thésards, les stagiaires, les amis, d'ici et d'ailleurs, rencontrés à Montpellier, en Guadeloupe et à la Réunion, pour leur sympathie, leur bonne humeur et le partage de mon quotidien.

Enfin un immense merci à mon épouse pour son soutien et sa patience, à mes parents pour leurs encouragements, leur humilité, et leur goût de la vie. Je sais qu'ils sont tous fiers de moi. Ils ont toujours été présents, même quand ils étaient loin.

Cette thèse a été financée par le gouvernement de la République Arabe de Syrie, ainsi que par le Cirad et la compagnie sucrière Cenicaña en Colombie. Je les remercie bien vivement de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

TABLE DES MATIERES

<i>Avant propos</i>	i
TABLE DES MATIERES	iii
ABREVIATIONS ET ACRONYMES	vi
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I.....	4
Revue bibliographique :	4
Présentation du pathosystème canne à sucre-SCYLV et définition de la problématique	4
1. LA CANNE A SUCRE.....	5
1.1. Historique	5
1.2. Position taxonomique.....	6
1.3. Morphologie	7
1.4. Physiologie et cycle du développement	7
1.5. Distribution géographique et importance économique	9
1.6. Les débouchés de la canne à sucre	9
1.7. Les principales maladies de la canne à sucre	10
2. LA MALADIE DE LA FEUILLE JAUNE DE LA CANNE A SUCRE	11
2.1 Historique et distribution géographique.....	11
2.2 Symptomatologie	11
2.3. L'agent causal	12
3. LE SCYLV, SES HOTES ET SES VECTEURS.....	13
3.1. Caractéristiques, structure et expression de génome du SCYLV.....	13
3.2. Structure des virions.....	15
3.3. Caractéristiques sérologiques.....	15
3.4. La gamme d'hôtes et les vecteurs du SCYLV	16
3.5. Histologie et physiopathologie.....	16
3.6. Impact du SCYLV sur le rendement	17
3.7. Dynamique du SCYLV au champ et dans la plante de canne à sucre	18
3.8. Épidémiologie du SCYLV	18
3.9. Résistance au SCYLV	19
3.10. Diagnostic du SCYLV	20
3.11. Méthodes de lutte contre le SCYLV	20
4. LES ENJEUX.....	21
4.1. Enjeu agronomique	21

4.2. Enjeu scientifique.....	22
CHAPITRE II	23
Variabilité génétique et distribution géographique de différents génotypes du SCYLV	23
Résumé.....	24
INTRODUCTION	25
1. GENERATION DE LA VARIABILITE DES VIRUS A ARN	25
1.1. Les erreurs liées aux mutations : substitutions, insertions et délétions.....	26
1.2. Les erreurs liées aux recombinaisons	27
1.3. Les erreurs liées au réassortiment	28
2. PHYLOGENIE MOLECULAIRE.....	29
2.1. Méthodes fondées sur les distances	30
2.1.1. UPGMA “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean”	30
2.1.2. NJ “Neighbor-Joining”	31
2.2. Méthodes fondées sur les caractères	31
2.2.1 Méthode de Parcimonie	31
2.2.2 Méthode du Maximum de vraisemblance	32
2.3. Fiabilité des arbres phylogénétiques.....	32
2.3.1. Le bootstrapping	32
2.3.2. Permutation.....	33
2.4 Enraciner un arbre.....	33
2.5. Variation de phylogénie.....	33
3. VARIABILITE ET DIVERSITE DES LUTEOVIRIDAE	34
4. DIVERSITE GENETIQUE DU SCYLV	36
4.1. La feuille jaune de la canne à sucre est causée par au moins trois génotypes différents de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> , dont un génotype prédominant à l'île de la Réunion.	38
4.2. Distribution géographique de quatre génotypes du <i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	56
CHAPITRE III	76
Evolution du <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> et description d'une nouvelle espèce virale, le <i>Sugarcane yellow leaf Cuba virus</i> (SCYLCV).....	76
Résumé.....	77
1. INTRODUCTION	78
2. MECANISMES MODULANT LA VARIABILITE DES VIRUS	78
2.1. La notion de quasi-espèce virale.....	79
2.2. La sélection	80

2.2.1. Préservation de la fonctionnalité du génome (structure, expression et réplication)	81
2.2.2. La sélection par l'hôte	82
2.2.3. La sélection par le vecteur	84
2.3. La dérive génétique	85
2.4. Apports de la génétique des populations à l'évolution	87
2.5. Objectif de l'étude	89
2.6. Révélation d'une nouvelle espèce virale par l'analyse phylogénétique du <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> et description d'événements évolutifs	911
CHAPITRE IV	127
Caractérisation de la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV	127
Résumé	128
Introduction	130
1. TRANSMISSION ET INTERACTIONS VIRUS/VECTEUR.....	131
2. DIVERSITE DU POUVOIR PATHOGENE CHEZ LES <i>LUTEOVIRIDAE</i>	133
2.1. Objectifs de l'étude	135
2.2. Variation des populations virales et caractéristiques de croissance de deux variétés de canne à sucre naturellement infectées par le <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> dans différentes zones géographiques	136
2.3. Variation de la capacité d'infection et de la virulence entre géotypes de <i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	166
CHAPITRE V	193
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	202

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

Divers

ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNsg : ARN(s) subgénomique(s)
 AsP : Antisérum polyclonal
 BET : Bromure d'éthidium
 BSA : Bovine Serum Albumin [«Albumine sérique bovine »]
 CENICAÑA : "Centro de investigacion de la caña de azúcar de Colombia"
 COPERSUCAR : "Cooperativa de productores de caña, açúcare álcool do estado de São Paulo"
 CP : « coat protein » [protéine de capside]
 Da : dalton [unité de masse atomique]
 DAS-ELISA : "Double antibody sandwich ELISA"
 dNTP : Désoxyribonuléotide triphosphate
 DO : Densité optique
 DTT : Dithiothréitol
 EDTA : Acide éthylène diamine tétracétate
 ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay »
 ET : efficacité de transmission
 GFP : « green fluorescent protein » [protéine verte fluorescente]
 GSA : Glandes salivaires accessoires
 HC-Pro : Facteur assistant ["Helper Component-Protease"]
 ICTV : "International committee for the taxonomy of viruses"
 IEM : "Immunosorbent electron-microscopy"
 ISEM : "Immuno sorbent electronic microscopy"
 IgG : Immunoglobuline G
 IPTG : Isopropylthi β -D-galactosidase
 kb : Kilobase ou 1000 bases
 kDa : kilodalton = 1000 Da
 LRTs : Likelihood ratio tests
 MLO : « Mycoplasma like organism » [Organisme de type mycoplasme]
 MLEs : Maximum likelihood estimates (estimateurs de maximum de vraisemblance)
 MP : « Movement protein » [protéine de mouvement]
 MS : Murashige et Skoog
 nt : nucléotide
 ORF : Cadre couvert de lecture [« Open reading frame »]
 PAML : Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood
 Pb : Paire de bases
 PBS : "Phosphate buffered saline" [Tampon phosphate]
 PCR : "Polymerase chain reaction" [Réaction en chaîne de la polymérase]
 PNPP : Para-nitrophényl phosphate
 PTGS : « Post transcriptional gene silencing » [Extinction post-transcriptionnelle de gènes]
 RFLP : "Restriction fragment length polymorphism" [Polymorphisme de longueur des fragments de restriction]
 RDP : Recombination Detection Program
 RdRp : « RNA dependant RNA polymerase » [RNA

Acronymes des virus

ACMV : *African cassava mosaic virus*, Begomovirus
 AMV : *Avian myeloblastosis virus*, Retrovirus
 BaYMV : *Barley yellow mosaic virus*, Bymovirus
 BChV : *Beet chlorosis virus*, Polerovirus
 BCMV : *Bean common mosaic virus*, Potyvirus
 BMV : *Brome mosaic virus*, Bromovirus
 BMYV : *Beet mild yellowing virus*, Polerovirus
 BNYVV : *Beet necrotic yellow vein virus*, Benyvirus
 BrYV : *Brassica yellowing virus*, Polerovirus
 BWYV : *Beet western yellows virus*, Polerovirus
 BYDV-PAV : *Barley yellow dwarf virus-PAV*, Luteovirus
 BYMV : *Bean yellow mosaic virus*, Potyvirus
 CABYV : *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, Polerovirus
 CaMV : *Cauliflower mosaic virus*, Caulimovirus
 CCMV : *Cowpea chlorotic mottle virus*, Bromovirus
 CMV : *Cucumber mosaic virus*, Cucumovirus
 CNV : *Cucumber necrosis virus*, Tombusvirus
 CTV : *Citrus tristeza virus*, Closterovirus
 CYDV-RPS : *Cereal yellow dwarf virus-RPS*, Luteovirus
 CYDV-RPV : *Cereal yellow dwarf virus-RPV*, Luteovirus
 FMDV : *Foot-and-mouth disease virus*, Aphthovirus
 HCV : *Hepatitis virus C*, Hepacivirus
 HIV-1 : *Human immunodeficiency virus-type 1*, Lentivirus
 ICMV : *Indian cassava mosaic virus*, Begomovirus
 LMV : *Lettuce mosaic virus*, Potyvirus
 MLV : *Murine leukemia virus*, Gammaretrovirus
 MSV : *Maize streak virus*, Mastrevirus
 MWMV : *Moroccan watermelon mosaic virus*, Potyvirus
 PAMV : *Potato aucuba mosaic virus*, Potexvirus
 PEMV-1 : *Pea enation mosaic virus-1*, Enamovirus
 PEMV-2 : *Pea enation mosaic virus-2*, Enamovirus
 PLRV : *Potato leafroll virus*, Polerovirus
 PPV : *Plum pox virus*, Potyvirus
 RTBV : *Rice tungro bacilliform virus*, Badnavirus
 SbDV : *Soybean dwarf virus*, Luteovirus
 SCMV : *Sugarcane mosaic virus*, Potyvirus
 SCYLP : *Sugarcane yellow leaf phytoplasma*
 SMV : *Soybean mosaic virus*, Potyvirus
 SNV : *Spleen necrosis virus*, Retrovirus
 TMGMV : *Tobacco mild green mosaic virus*,
 TMV : *Tobacco mosaic virus*, Tobamovirus
 TuMV : *Turnip mosaic virus*, Potyvirus
 TVMV : *Tobacco vein mottling virus*, Potyvirus
 TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*, Begomovirus
 VSV : *Vesicular stomatitis virus*, Vesiculovirus
 WSMV : *Wheat streak mosaic virus*, Tritimovirus
 ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus*, Potyvirus

polymérase RNA dépendante]
RNase : Ribonucléase
rpm : Rotation par minute
RTD : « Readthrough domain » [Domaine de translecture]
RT (RTP) : « Readthrough protein » [Protéine de
translecture]
TAE : Tris acétate EDTA
TBE : Tris borate EDTA
URT : « Untranslated region » [Région non traduite]
VPg : « Virus protein genome-linked » [Protéine virale
liée au génome]
YLS: Yellow leaf syndrome [Syndrome de la feuille
jaune]

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les virus et leurs hôtes végétaux se livrent depuis toujours une guerre impitoyable, motivée par leur survie propre et celle de leur descendance (Teycheney, 1999). Ils peuvent être considérés comme des agents pathogènes pour toutes les espèces végétales, et ils sont la cause de pertes considérables de la production agricole mondiale. Ces virus sont des parasites intracellulaires qui accaparent la machinerie métabolique de la cellule de leur hôte afin de produire leurs propres composants pour se multiplier. Cette multiplication virale va finir par provoquer des modifications métaboliques en créant un déséquilibre dans la plante et la destruction de la cellule. Ce phénomène laisse ensuite la place à l'installation de la maladie qui peut aller jusqu'à la mort de la plante (Astier *et al.*, 2001).

L'origine des virus reste inconnue et leur position dans le monde vivant prête encore à débat. De nombreux auteurs s'accordent pour placer les virus en dehors du monde vivant car ils ne possèdent pas la caractéristique fondamentale de tous les êtres vivants qui est de pouvoir se reproduire eux-mêmes. Les virus sont statiques et ne présentent aucune physiologie de relation, ni de nutrition. En revanche, leur structure génétique et leur mode de vie « parasite obligatoire » ne peut nous empêcher de leur trouver une grande affinité avec les organismes vivants et le débat reste ouvert (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Phytovirus>).

L'agriculture moderne est continuellement défiée par l'évolution rapide des agents pathogènes et notamment les virus. L'adaptation de ces virus à des nouveaux hôtes est souvent observée sur des pas de temps très courts. Bien que nous connaissions beaucoup de détails sur les pathosystèmes hôte-virus, notre connaissance de l'évolution de la virulence reste rudimentaire, bien qu'essentielle pour faire face aux problèmes des maladies infectieuses émergentes (Ebert, 1998).

Les virus à ARN ont une capacité d'adaptation corrélée à l'énorme potentiel de variation de leurs génomes. Comme tous les génomes, les acides nucléiques viraux varient au cours du temps. Cette variabilité, loin d'être un handicap, est bien au contraire un atout essentiel dans la course à l'efficacité et à l'adaptabilité. Le séquençage des génomes viraux a permis de construire les groupes phylogénétiques et de voir se dessiner une évolution modulaire.

Par ailleurs, les virus à ARN ont un potentiel évolutif très important car leur multiplication se déroule dans l'intimité génétique de la cellule hôte. De nombreux réarrangements, mutations, échanges de gènes sont possibles. Malgré tout, les lignées de virus ont évolué de façon indépendante les unes des autres. En effet, comme la plupart des endoparasites, les virus se multiplient en vase clos dans leurs hôtes. L'évolution en parallèle

des souches virales et des hôtes résistants (co-évolution) est à l'origine d'une grande spécialisation des virus vis-à-vis de leur hôte (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Phytovirus>). Ainsi, on trouvera des virus capables de n'attaquer qu'une seule espèce ou qu'une seule famille de végétaux tel que le *Sugarcane yellow leaf virus* qui, à ce jour, n'a été associé qu'à des espèces du genre *Saccharum* (Scagliusi & Lockhart, 2000). D'autres ont un spectre d'hôte très large comme le *Cucumber mosaic virus* (CMV) qui attaque plusieurs centaines d'espèces végétales. La prolifération des virus à l'intérieur des tissus végétaux peut dans certains cas n'entraîner aucun symptôme visible dans un premier temps (phénomène de masquage) mais, le plus souvent, les attaques virales se manifestent par des symptômes tels que marbrures, fasciations ou jaunissements des feuilles.

Les maladies virales des plantes sont des maladies persistantes ; le végétal reste une source de virus toute sa vie durant et l'infection peut se propager à l'ensemble d'une culture. En général, toutes les infections virales débutent par des symptômes marqués, puis des mécanismes réactionnels se mettent en place et la maladie devient moins apparente, bien que le virus persiste (Dutilleul et Lainé, 2001). On ne connaît pas de traitements phytosanitaires efficaces et peu coûteux contre les maladies virales. On peut cependant prévenir la dissémination de certaines d'entre elles en luttant contre leurs vecteurs (par exemple les pucerons).

La localisation du virus dans la plante est très hétérogène. Au niveau tissulaire, on distingue deux groupes de virus (Dutilleul & Lainé, 2001) : les virus à mosaïque, se situant dans les cellules du parenchyme lacuneux et palissadique, et les virus à jaunisse (ou *Luteovirus*), localisés dans le phloème (liber) ou dans les cellules compagnes. Au niveau cellulaire, les virus se localisent préférentiellement dans le cytoplasme, les vésicules cytoplasmiques ou dans le noyau. A côté des symptômes macroscopiques (mosaïque, nanisme, jaunissement, etc.), on observe des symptômes viraux subcellulaires caractérisés par des inclusions cristallines ou amorphes constituées d'amas de particules ou de protéines virales (Dutilleul & Lainé, 2001). Les modes de réplication des phytovirus sont très variés et dépendent du type de génome viral. Certains nécessitent une phase nucléaire, d'autres sont uniquement cytoplasmiques. Chaque virus possède un mode de transmission de plante à plante spécifique. Généralement, le vecteur est un invertébré (puceron ou nématode par exemple), mais certains virus se transmettent par les champignons, le pollen ou par contact direct (Astier *et al.*, 2001).

La maladie de la feuille jaune, précédemment appelée syndrome de la feuille jaune ou YLS « Yellow leaf syndrome », est une maladie émergente et une des maladies les plus importantes de la canne à sucre au cours de ces deux dernières décennies. Elle a été décrite

pour la première fois à Hawaï en 1989 (Schenck, 2001) et au Brésil en 1990 (Burnquist & Vega, 1996 ; Vega *et al.*, 1997). L'agent causal de la feuille jaune de la canne à sucre, le *Sugarcane yellow leaf virus* ou SCYLV, a seulement été identifié en 1996 par Lockhart *et al.* (1996). Étant donné la description récente du SCYLV, les informations scientifiques disponibles à ce jour sur ce virus sont limitées. L'objectif de ce travail de thèse est de mieux connaître ce virus et notamment sa diversité génétique et la variabilité de son pouvoir pathogène, éléments indispensables à la compréhension de l'évolution des populations virales et à la lutte contre la maladie.

Ce manuscrit de thèse est présenté sous la forme de cinq chapitres principaux, comprenant cinq articles répondant aux objectifs présentés. Dans le premier chapitre de ce manuscrit, une analyse bibliographique sera présentée sur la canne à sucre, la maladie de la feuille jaune et son agent causal. Dans le deuxième chapitre qui s'articule sur deux articles, nous traiterons l'étude de la diversité génétique du SCYLV et la distribution géographique de quatre géotypes du virus. Le troisième chapitre comprenant un article, sera consacré à l'évolution moléculaire du virus et la description d'une nouvelle espèce, le *Sugarcane yellow leaf Cuba virus* (SCYLCV). Dans le quatrième chapitre qui s'articule aussi sur deux articles, nous traiterons la caractérisation de la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV. Dans le cinquième et dernier chapitre, une discussion finale et les perspectives de ce travail seront présentées.



Figure 1 : Origine et distribution de la canne à sucre primitive dans le Pacifique sud
<http://www.troz.uni-hohenheim.de/teaching/Exkursions/CR04/CRSPS/SPSvaclavicek.pdf> (d'après Annika Vaclavicek). Les flèches indiquent le transfert de la canne à sucre à partir de la Papouasie Nouvelle-Guinée



Figure 2 : Diffusion de la canne noble, *Saccharum officinarum*, à partir de la Nouvelle-Guinée (d'après Fährasmane, 1997). Les chiffres romains indiquent les siècles durant lesquels les transferts de la canne à sucre ont eu lieu.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : PRESENTATION DU PATHOSYSTEME CANNE A SUCRE-SCYLV ET DEFINITION DE LA PROBLEMATIQUE

1. LA CANNE A SUCRE

1.1. Historique

La canne à sucre est certainement l'une des plantes les plus anciennement cultivées à la surface de la terre puisque sa découverte remonterait à 9000 ans environ en Papouasie-Nouvelle-Guinée (<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/sucre/descript.htm>). Environ, deux millénaires plus tard, la canne à sucre fut introduite en Nouvelle-Calédonie, aux Nouvelles-Hébrides et aux Îles Fidji, puis successivement en Inde, aux Philippines et en Chine (<http://www.troz.uni-hohenheim.de/teaching/Exkursions/CR04/CRSPS/SPSvaclavicek.pdf>).

Le sucre fut ensuite importé au Moyen-Orient par le biais des différentes conquêtes et du développement du commerce, puis en Europe où les Croisés l'ont ramené de Syrie et de Palestine notamment (Purseglove, 1979) (Figures 1 et 2).

La première référence écrite sur la canne à sucre remonte à Alexandre Le Grand, c'est-à-dire à l'an 327 avant Jésus-Christ (Purseglove, 1979). A cette époque, un de ses généraux, Néarque, écrivit à propos de la canne à sucre : "un roseau en Inde qui produit du miel sans le concours des abeilles et à partir duquel est produite une boisson intoxicante, bien que ni les graines, ni les fruits ne soient utilisés". En Inde, on pense que la canne à sucre aurait une origine divine. Pendant une cinquantaine d'années, de la fin du XVIIe siècle au milieu des années 1700, le sucre a été considéré comme une épice de luxe et n'était destinée qu'aux classes les plus aisées. Puis, au cours du siècle suivant, jusqu'en 1850 environ, le sucre a commencé à être utilisé par les classes moyennes, notamment sous l'impulsion de la Révolution industrielle et de l'élévation du niveau de vie des travailleurs. Simultanément, bien qu'ayant dominé la production sucrière et son commerce pendant plusieurs siècles, la canne à sucre a vu sa part de marché décliner au profit du sucre provenant de la betterave (<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/sucre/descript.htm>).

La production mondiale de sucre se répartit actuellement à hauteur de 75% pour la canne à sucre et 25% pour la betterave. Les tendances entre le volume de sucre de canne produit à partir de la canne à sucre et à partir de la betterave ont été parfaitement corrélées jusqu'en 1915 environ, puis un écart entre les deux de 7 à 8 millions de tonnes (en faveur de la canne à sucre) s'est maintenu pendant plusieurs décennies de 1915 à 1970 (Figure 3). A partir des années 1970, le volume de sucre de canne a décollé, notamment sous l'influence de l'explosion de la production brésilienne pour atteindre finalement un différentiel de près de 58 millions de tonnes entre les productions cannière et betteravière en 2005 (FAO, 2005).

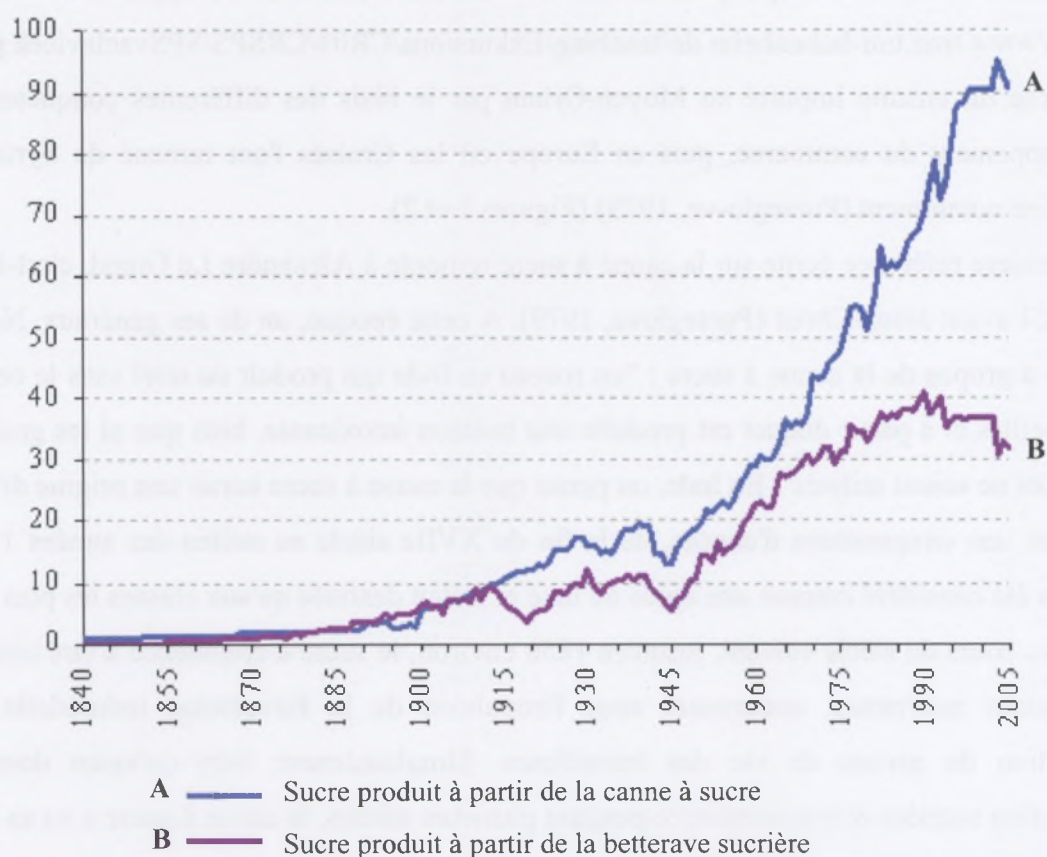


Figure 3 : Production mondiale de sucre en millions de tonnes à partir de la canne à sucre et de la betterave sucrière de 1840 à 2005 : Source : Secrétariat de la CNUCED d'après les données statistiques du Sugar Trading Manual (2000) et des estimations du Secrétariat.

Parmi les principaux pays producteurs de canne à sucre, le Brésil et l'Inde ont représenté ensemble plus de la moitié de la production mondiale depuis le début des années 1960.

A partir de 1961, la part du Brésil dans la production mondiale de sucre a commencé à augmenter, atteignant ainsi le quart de la production mondiale en 1990 et près du tiers en 2005.

1.2. Position taxonomique

La canne à sucre est une monocotylédone de la famille des *Poaceae*, de la tribu des *Andropogoneae* et du genre *Saccharum* (Daniels & Roach, 1987; Purseglove, 1979).

La canne à sucre est polyploïde, hétérozygote et propagée de façon clonale. Les nouvelles variétés sont recherchées dans la première descendance issue du croisement entre deux clones ou après autofécondation d'un clone. Aujourd'hui, il existe six espèces connues appartenant au genre *Saccharum*, parmi lesquelles deux catégories sont distinguées (Daniels & Roach, 1987; Grivet *et al.*, 2004) :

➤ 1/ les espèces non sucrières qui constituent les espèces sauvages ;

* *Saccharum spontaneum* ($2n = 40$ à 128), pauvre en sucre, utilisée en amélioration variétale comme source de résistance à beaucoup de maladies telles que la mosaïque et la gommose (maladie provoquée par *Xanthomonas vascularum*) (Rott *et al.*, 2000).

* *Saccharum robustum* ($2n = 60$ à 80), un hybride naturel entre plusieurs espèces de *Saccharum*, et son habitat naturel se situe sur les berges des rivières.

Saccharum edule ($2n = 60$ à 80), cultivée pour ses inflorescences comestibles.

➤ 2/ les espèces sucrières riches en sucre, domestiquées et exploitées par l'homme.

* *Saccharum officinarum* ($2n = 80$), appelée canne noble en raison de sa forte teneur en sucre et de sa faible quantité en fibres, bien qu'elle soit sensible à beaucoup de maladie, à l'exception de la gommose. Son aire d'origine serait la Nouvelle-Guinée étant donné que l'on y rencontre le plus de diversité (Brandes *et al.*, 1939).

* *Saccharum barberi* ($2n = 81$ à 124) et *Saccharum sinense* ($2n = 111$ à 120) qui résulteraient d'un croisement entre *S. officinarum* et *S. spontaneum*. De nombreux clones sont résistants aux principales maladies de la canne à sucre.

Les cultivars (cv.) modernes de canne à sucre (*Saccharum* spp.) sont des hybrides interspécifiques artificiels entre une ou plusieurs espèces domestiquées et l'espèce sauvage *S.*

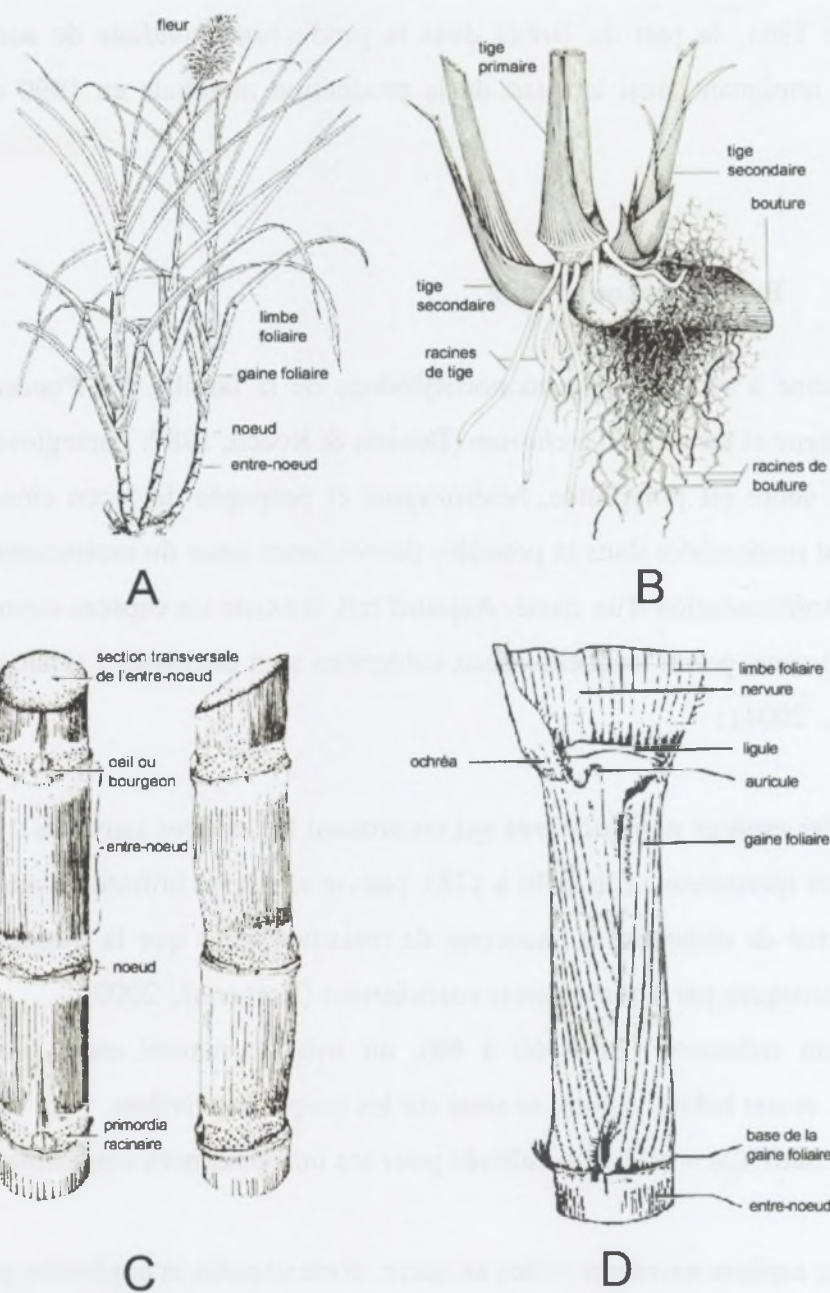


Figure 4 : Caractéristiques anatomiques et morphologiques de la canne à sucre. (A), aspect général d'une touffe de canne. (B), bouture de canne germée illustrant le développement des racines de tige et de bouture. (C), portion d'une tige de canne montrant les détails d'un nœud et d'un entre-nœud. (D), portion d'une feuille de canne montrant les différentes parties qui la composent (Julien *et al.*, 1989 ; Soopramanien, 2000).

spontaneum. Ce sont des aneuploïdes complexes à forte polyploïdie ($2n > 100$) reproduits par voie végétative (Feldmann *et al.*, 1997).

1.3. Morphologie

D'un point de vue morphologique, la canne à sucre, comme toutes les *Poaceae*, se présente sous la forme d'une touffe de tiges (encore appelées talles) possédant un système racinaire fibreux, de grands épis de fleurs et de longues feuilles (Figure 4).

La tige de canne à sucre peut atteindre 2 à 5 mètres de hauteur pour un diamètre variant de 2 à 6 centimètres (van Dillewijn, 1960). Elle est formée d'une succession de nœuds et d'entre-nœuds d'environ 20 cm de longueur. Le nombre de tiges par touffe de canne peut ainsi varier de 5 à 15 selon la variété. La tige est constituée d'une série de phytomères qui prennent naissance au niveau du méristème végétatif apical au sommet de la tige. Un phytomère est constitué d'un entre-nœud et d'un nœud qui porte la gaine prolongée par le limbe foliaire (Figure 4).

Les feuilles de canne à sucre sont ordinairement insérées de façon alterne sur les nœuds et sont composées de deux parties, la gaine (environ 20 cm) et le limbe foliaire (mesurant plus d'un mètre) séparés par une articulation comprenant l'ochréa, la ligule et les auricules. La gaine, de forme tubulaire, est la partie basse de la feuille qui s'enroule autour de l'entre-nœud (Van Dillewijn, 1960).

Les racines se développent à partir des primordias racinaires lorsqu'une bouture est plantée dans les conditions favorables. Deux types de racines se développent successivement qui jouent des rôles différents. Tout d'abord les racines de boutures qui sont minces et ramifiées prennent en charge l'alimentation hydrique et minérale des premières tiges ; puis, les racines de tige, plus épaisses et peu ramifiées, prennent le relais de l'alimentation de la future plante (Sopramanien, 2000). A la maturité de la plante, on distingue généralement trois sortes de racines: 1/ les racines superficielles qui assure l'alimentation hydrique et minérale de la plante (représentent 90% du poids racinaire), 2/ les racines de soutien qui assurent la fixation de la plante et l'absorption d'eau et enfin, 3/ les racines "cordon", peu nombreuses et profondes dans le sol, qui jouent un rôle dans la lutte contre la sécheresse (Blackburn, 1984).

1.4. Physiologie et cycle du développement

La canne à sucre, lorsqu'elle est mature, peut subir une induction florale dans des conditions environnementales très particulières, incluant une nyctipériode appropriée, des

températures minimales et maximales données et une hygrométrie particulière (Julien *et al.*, 1989). L'inflorescence de la canne à sucre (aussi appelée aigrette ou flèche) est un panicule rose argenté portant des fleurs hermaphrodites donnant des caryopses de très petite taille (Van Dillewijn, 1960). Les graines fertiles, encore appelées "fuzz", sont exclusivement utilisées en création variétale (Feldmann *et al.*, 1997). La canne à sucre cultivée de façon commerciale est multipliée de façon végétative grâce aux boutures de tige, voire aux cannes entières dans certains pays. Dans les conditions adéquates, les bourgeons latéraux se développent à partir de la bouture pour donner la tige primaire d'où se développeront les talles secondaires, puis les talles tertiaires,...définissant ainsi le tallage. Après la floraison, ou un dommage du méristème apical (qui peut-être causé par certaines maladies, des produits chimiques ou encore certains insectes tels que les foreurs de tiges), les bourgeons latéraux pourront se développer sur les tiges de canne matures et former ce que l'on appelle les "ailerons latéraux" (Soopramanien, 2000). Après la germination, les trois étapes importantes du développement de la canne à sucre sont le tallage, la croissance de tige et la maturation.

Le tallage intervient tout de suite après la germination. Le nombre de talles maximal lors de la culture ou le nombre de talles au moment de la récolte dépendent de nombreux facteurs tels que la variété de canne à sucre, l'humidité et la température du sol, la quantité d'azote disponible, l'ensoleillement et l'incidence des ravageurs ou de certaines maladies, tel que le charbon notamment (Soopramanien, 2000).

La croissance de tige, consiste en une phase de multiplication, de différenciation et d'élongation cellulaire qui intervient durant une période déterminée dépendante de facteurs environnementaux. C'est une phase de très forte croissance végétative et d'activité photosynthétique maximale au cours de laquelle la canne à sucre assimile les matières organiques (azote, phosphore, potassium et autres minéraux) nécessaires à sa croissance et sa physiologie (Soopramanien, 2000). Les matières organiques non utilisées par la plante (< 40%) seront stockées sous forme de saccharose. D'un point de vue physiologique, la canne à sucre possède une activité photosynthétique de type C4, particulièrement efficace pour la fixation du gaze carbonique et qui peut être affectée par la présence de maladies (Alexander, 1973).

La maturation correspond à une phase de synthèse et d'accumulation de saccharose importante, à hauteur de 65-70% de l'utilisation des ressources carbonées. La variété de canne à sucre, mais aussi les conditions environnementales, l'irrigation ou l'utilisation de produits chimiques peuvent influencer la maturation (Soopramanien, 2000).

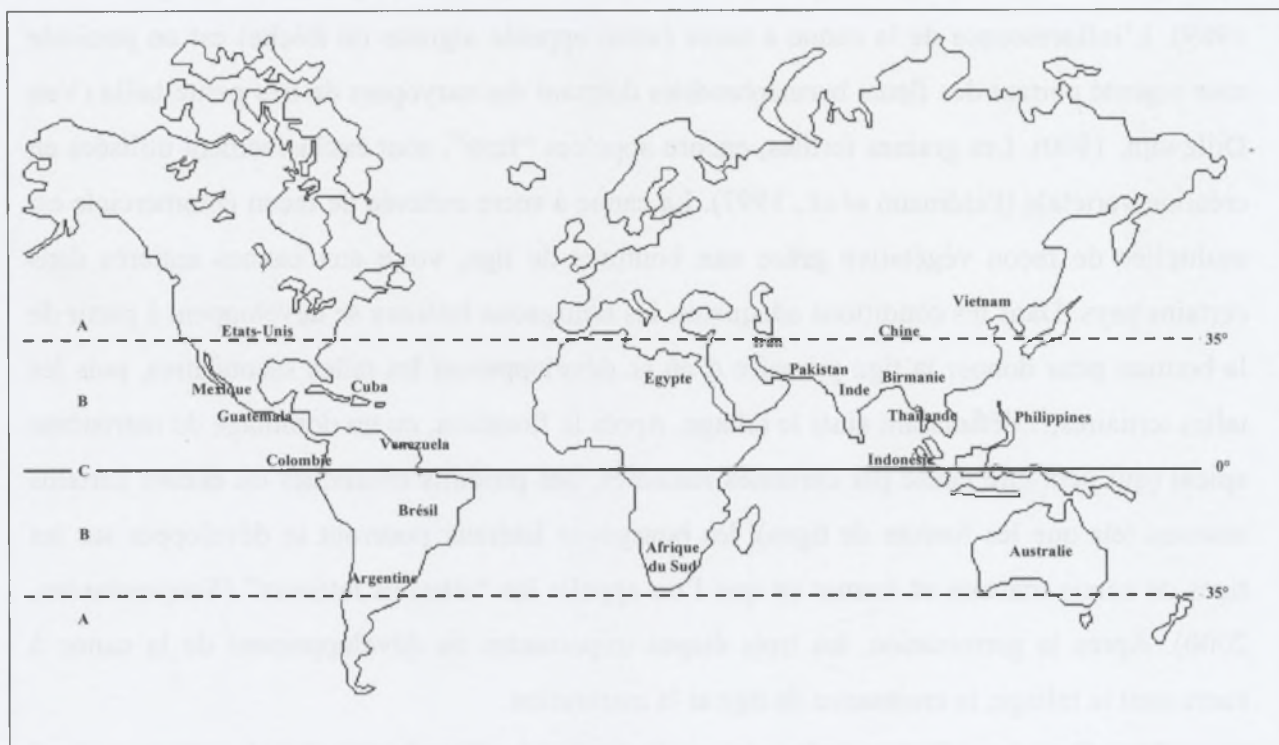


Figure 5 : Grandes zones de production de la canne à sucre dans le monde et les principaux pays producteurs (en tonnes de canne; F.A.O, 2004), A: la zone sub-tropicale, B: la zone tropicale, C: la zone équatoriale (Fauconnier et Bassereau, 1970).

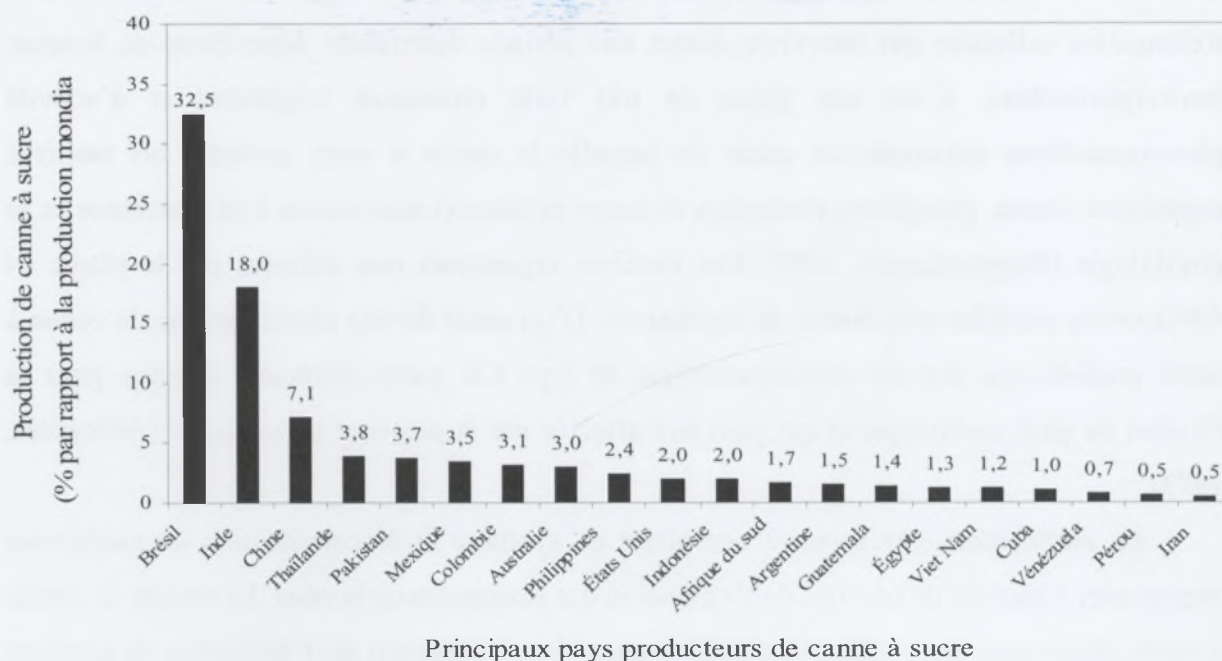


Figure 6 : Les principaux pays producteurs de canne à sucre dans le monde (F.A.O, 2005)

1.5. Distribution géographique et importance économique

L'aire de culture de la canne à sucre est principalement dans les régions tropicales. Elle s'étend de 37° de latitude Nord de l'Espagne méridionale et de 34° dans le nord-ouest du Pakistan à 30 °de latitude sud en Argentine et aux extrêmes méridionaux de l'Australie (figure 5) (Fauconnier & Bassereau, 1970 ; Jenkins, 1966).

La plante n'est pas connue à l'état spontané. Sa contrée d'origine pourrait être dans l'archipel de la Nouvelle-Guinée, d'où elle aurait été répandue par l'homme d'abord dans toutes les îles du Pacifique et dans l'Océan Indien jusqu'en Malaisie ou bien dans la péninsule indochinoise. Elle est très anciennement cultivée en Inde. Aujourd'hui, elle est cultivée dans tous les pays tropicaux ou tempérés chauds de l'ancien et du nouveau monde (Purseglove, 1979). Comme le blé, le riz et le maïs, la canne appartient à la grande famille des *Poaceae*. Contrairement à ses cousines, la canne à sucre n'est pas cultivée pour ses graines mais bien pour ses tiges qui renferment un jus sucré.

La canne à sucre constitue l'une des plus importantes cultures des régions tropicales et subtropicales, et elle fut la seule source importante de sucre jusqu'au début du XIXe siècle. En effet, cette plante est cultivée principalement pour le saccharose (10 à 18%). Plus de 100 pays font pousser cette plante sur près de 20 milliards d'ha avec une récolte de 1,3 milliards de tonnes en 2005 (FAO, 2005). Une douzaine de pays se partagent le marché de la canne à sucre mais le Brésil, l'Inde et la Chine sont les plus gros producteurs (FAO, 2005) (Figure 6). Au Brésil, la canne à sucre est utilisée non seulement pour produire du saccharose, mais aussi de l'alcool entrant dans la composition de carburant pour les automobiles (<http://perso.orange.fr/lameca/dossiers/canne/index.htm>).

1.6. Les débouchés de la canne à sucre

La canne récoltée, sous forme de tronçons de tiges, est transportée dans une sucrerie et broyée dans des moulins pour produire un liquide sucré, le vesou, qui sera clarifié puis concentré pour extraire le sucre cristallisé brut, la cassonade. Ce sucre sera ensuite transformé en sucre blanc dans une raffinerie. Le résidu liquide, encore très sucré, noirâtre et visqueux, est la mélasse. Cette dernière peut être utilisée pour l'alimentation du bétail, ou distillée pour produire une eau de vie, le rhum (plus exactement le tafia), ou encore pour de l'éthanol comme biocarburant. Le vesou est également distillé après fermentation pour obtenir le rhum agricole (http://fr.wikipedia.org/wiki/Canne_%C3%A0_sucre). Par ailleurs, dans les pays en

développement, les populations aspirant toujours à un niveau de vie plus élevé, la demande d'énergie devrait augmenter. Le doublement prévu de la population mondiale entraînera une hausse des coûts d'opportunité pour les céréales. Ce scénario stimulera l'utilisation d'énergies renouvelables, notamment de la biomasse, et créera des possibilités de nourrir le bétail avec des cultures non céréalières. La canne à sucre est une des cultures les plus efficaces pour convertir l'énergie solaire en biomasse. On peut aisément la fractionner en sucres facilement digestibles et en résidus fibreux, la bagasse. Cette dernière est utilisée pour faire du papier, du carburant et de la nourriture pour le bétail, ce qui permet de remplacer les céréales dans l'élevage intensif. L'énorme potentiel de la canne à sucre réside dans le secteur des énergies renouvelables. L'exploitation de cette caractéristique la rendra plus compétitive comme source d'alimentation animale. C'est dans le domaine clé des techniques de gazéification à petite comme à grande échelle qu'il faut intensifier la recherche-développement.

On prévoit que la demande accrue d'énergies renouvelables ainsi que la montée en flèche connexe des prix fourniront les stimulants nécessaires à cette fin (http://fr.wikipedia.org/wiki/Canne_%C3%A0_sucre).

1.7. Les principales maladies de la canne à sucre

La canne à sucre possède certaines particularités qui en font une culture très vulnérable à l'égard des maladies :

- le caractère pluriannuel de sa production rend son statut variétal (= ensemble des variétés cultivées dans une zone géographique à un moment donné) assez rigide ;
- l'implantation par boutures facilite la propagation des agents pathogènes ;
- l'uniformité de sa structure génétique, puisqu'il s'agit de clones, et la concentration géographique des parcelles sont favorables aux épidémies.

Les maladies représentent donc un risque très important qui peut affecter gravement les rendements. Plus d'une soixantaine de maladies ont été décrites chez la canne à sucre (Rott *et al.*, 2000). Elles sont causées par des bactéries, des champignons, des phytoplasmes ou des virus. Les deux principales maladies bactériennes sont actuellement l'échaudure des feuilles et le rabougrissement des repousses causées respectivement par *Xanthomonas albilineans* et *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Les trois principales maladies fongiques sont le charbon (*Ustilago scitaminea*), la rouille brune (*Puccinia melanocephala*) et la morve rouge (*Colletotrichum falcatum*). Les principales maladies virales sont les mosaïques provoquées par diverses espèces virales (*Sugarcane mosaic virus* ou SCMV, *Sorghum mosaic virus* ou SrMV, *Sugarcane streak mosaic virus* ou SCSMV), la galle foliaire de Fidji causée par le *Fiji disease*



Figure 7 : Distribution du SCYL dans les différents pays producteurs de canne à sucre dans le monde. Les rectangles indiquent les pays dans lesquels le virus a été détecté.

virus (FDV) et la feuille jaune causée par le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). Parmi les maladies causées par des phytoplasmes, la feuille blanche et la touffe herbacée sont les plus redoutables.

2. LA MALADIE DE LA FEUILLE JAUNE DE LA CANNE A SUCRE

2.1 Historique et distribution géographique

Les premiers symptômes de jaunissement foliaire sur canne à sucre ont été signalés sur les côtes de Hamakua à Hawaï en 1989, dans un champ de la variété H65-7052 (Schenck, 2001). Au début des années 1990, la société brésilienne COPERUCAR a constaté d'importantes baisses de rendement (20%) pour leur principale variété SP71-6163 qui présentait des jaunissements foliaires précoces (Burnquist & Vega, 1996 ; Vega *et al.*, 1997 ; Lockhart & Cronjé, 2000 ; Scagliusi et Lockhart, 2000 ; Rott *et al.*, 2005). Ces symptômes de jaunissement à Hawaï et au Brésil ont été regroupés sous le nom de « Yellow leaf syndrome » ou syndrome de la feuille jaune. Ils étaient identiques à ceux du Yellow wilt découvert et décrit en 1962 en Tanzanie (Ricaud, 1968) et dont l'origine est à ce jour encore inconnue.

Le syndrome de la feuille jaune a récemment été renommé maladie de la feuille jaune de la canne à sucre (Rott *et al.*, 2005). Plusieurs enquêtes sur la présence et la distribution de la maladie ont été réalisées dans la plupart des grands pays producteurs de canne à sucre, mais avec beaucoup de difficultés car les plantes sont souvent asymptomatiques. Il a été constaté que la maladie était largement répandue dans plus de 30 pays producteurs de canne à sucre en Asie, en Amérique du Nord et du Sud, en Afrique et en Australie (figure 7) (Anon, 1995; Comstock *et al.*, 1998 ; Grisham *et al.*, 1997 ; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002 ; Lockhart & Cronjé, 2000 ; Saumtaly & Moutia, 1997). La diffusion de la canne à sucre par bouturage et l'absence d'outils de diagnostic efficaces avant 1996, expliquent sans doute la présence du virus dans tant de pays.

2.2 Symptomatologie

La maladie de la feuille jaune est caractérisée par des jaunissements intenses de la nervure foliaire centrale sur la face inférieure des feuilles matures (feuilles de rang F3 à F6 en partant de la première feuille du sommet à ochréa visible) (Comstock & Gilbert, 2005). Le limbe reste généralement vert mais il peut aussi, dans des cas aigus, être décoloré et nécrosé.



Planche 1 : différents symptômes de la feuille jaune de la canne à sucre. (A) jaunissement de la nervure foliaire centrale avec extension du jaunissement dans le limbe (photo P. Rott) ; (B) jaunissement de la nervure foliaire centrale (photo Y. Abu Ahmad) ; (C) différents degrés de jaunissement de la nervure foliaire centrale (photo L. Rassaby) ; (D) jaunissement de la nervure foliaire centrale associée à une nécrose de l'extrémité du limbe (photo P. Rott).

Les feuilles les plus âgées montrent une nécrose des tissus, et parfois un rougissement de la nervure centrale dans sa partie distale (Planche 1 : A-D). Pour certains cultivars de canne à sucre, une coloration de la nervure et du limbe en rose foncé au lieu du jaune est possible. Ces symptômes sont en général visibles tardivement, à l'approche de la maturité, sauf pour les cultivars les plus sensibles.

Le type de jaunissement et la nature des symptômes dépendent souvent de la variété de canne à sucre et des conditions environnementales. Par ailleurs, le nombre de tiges par touffe, le tonnage et la taille des entrenœuds peuvent être affectés et réduits (Grisham *et al.*, 2001; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002). Le pourcentage de saccharose est plus élevé dans les feuilles infectées que dans les feuilles de cannes saines (Lockhart *et al.*, 2000). La maladie peut aussi affecter la qualité technologique de la canne et causer une réduction de saccharose dans les tiges (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002 ; Fontaniella *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2005b). Par ailleurs, on ne peut exclure que les différents types de jaunissement associés à la maladie sont causés par des variants de l'agent causal de la feuille jaune de la canne à sucre.

2.3. L'agent causal

Un virus appelé le *Sugarcane yellow leaf virus* ou SCYLV a été associé à la maladie de la feuille jaune (Maia *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). Ce virus ne semble cependant pas être le seul agent pathogène associé aux symptômes de jaunissement du feuillage de la canne à sucre. Fin des années 1990, des corps polymorphes sphériques et filamenteux de 50 à 880 nm de diamètre ont été détectés par microscopie électronique dans les vaisseaux du phloème de plantes présentant des symptômes de jaunissement de nervures foliaires chez divers cultivars de canne à sucre indemnes du virus (Cronjé *et al.*, 1998). Ces corps polymorphes correspondaient à des phytoplasmes et cet agent pathogène associé à la feuille jaune a été nommé sugarcane yellows phytoplasma ou SCYP par Cronjé *et al.* (1998) mais aussi sugarcane yellow leaf phytoplasma ou SCYLP par Arocha *et al.* (2005a) et *Candidatus* Phytoplasma graminis par Arocha *et al.* (2005b). Ces phytoplasmes appelés aussi "Mycoplasma Like Organisms" (MLO) sont des procaryotes sans paroi cellulaire qui possèdent un petit génome de 600 à 1600 kb, un faible taux de guanine et de cytosine, et ont des exigences nutritionnelles rares. Ils sont transmis par les cicadelles, les cixiides et les delphacides selon le mode persistant. Il a été récemment montré que le SCYLP est transmis par le delphacide *Saccharosydne saccharivora* (Arocha *et al.*, 2005a).

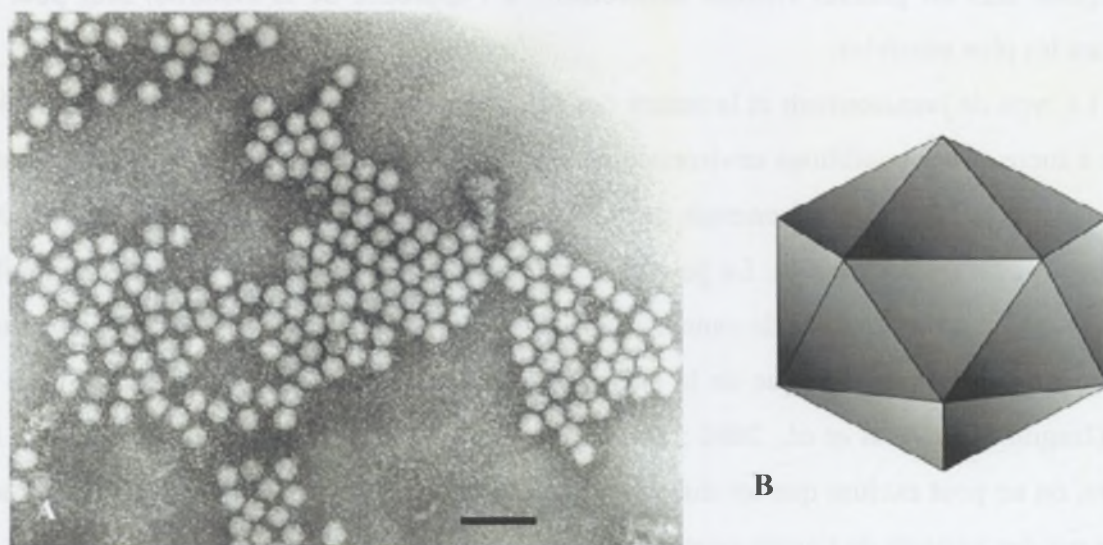


Figure 8 : (A) Particules virales du *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) (photo B. Lockhart), préparation virale purifiée et colorée négativement dans 2% de phosphotungstate de sodium, pH 5, échelle = 100 nm (B) structure schématique pour les particules de *Luteoviridae* (D'Arcy et Domier, 2005).

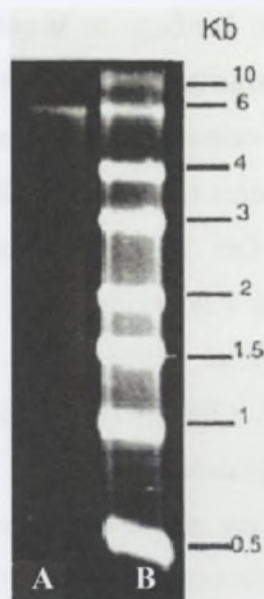


Figure 9 : (A) Extrait d'ARN génomique du SCYLV visualisé par coloration par bromure d'éthidium après une électrophorèse sur gel d'agarose sous conditions dénaturantes ; (B) marqueur de taille (ssRNA) (reproduit de Scagliusi et Lockhart, 2000).

Le SCYLV semble être plus répandu (34 pays ont rapporté la présence du SCYLV) (Figure 7) que le SCYLP qui n'a été décrit à ce jour qu'en Afrique du sud (Cronjé *et al.*, 1998), à Cuba (Arocha *et al.*, 2005a,b) et à l'île de Maurice (Aljanabi *et al.*, 2001). On note aussi que ces deux agents pathogènes ne sont pas toujours détectés dans les plantes présentant des jaunissements foliaires. En effet, ces symptômes peuvent aussi être liés à d'autres facteurs biotiques ou abiotiques comme les conditions de stress, une déficience ou un excès en nutriments ou en sels minéraux (Borth *et al.*, 1994, Schenck *et al.*, 1997), une initiation florale, une attaque de foreurs, l'approche de la maturité (Matsuoka & Meneghin, 1999), l'entrée en saison froide ou un excès d'eau (Comstock *et al.*, 1994 et 1998; Borg *et al.*, 1997; Lockhart & Cronjé, 2000). Malgré le caractère aspécifique des symptômes, de nombreux jaunissements foliaires sont liés à la présence du SCYLV dans la plante, surtout pour les cultivars sensibles à la maladie. La synergie entre les symptômes de la feuille jaune et les conditions de stress rendent difficile l'appréciation de l'effet de chacun. Afin de distinguer les maladies à jaunisse causées par le virus et le phytoplasme, les noms de "yellow leaf" (= feuille jaune) et leaf yellows ont été proposés respectivement pour le SCYLV et le SCYP (Rott *et al.*, 2005).

3. LE SCYLV, SES HOTES ET SES VECTEURS

3.1. Caractéristiques, structure et expression de génome du SCYLV

Le SCYLV partage des propriétés génomiques avec les membres des genres *Polyomavirus* et *Luteovirus* (Borg *et al.*, 1999) et il a été assigné au genre *Polyomavirus* de la famille des *Luteoviridae* par le Comité International de Taxonomie des Virus, en se basant sur ses fortes similarités avec la moitié 5' du génome des polyomavirus (D'Arcy et Domier, 2005 ; Moonan *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Le génome du SCYLV a été entièrement séquencé et caractérisé (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). C'est un virus à ARN simple brin, à un seul composant, de polarité positive et à symétrie icosaédrique (Figure 8). Le génome est composé de 5895-5899 nucléotides avec une masse moléculaire d'environ 2×10^6 daltons (Figure 9) (Moonan *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2000). Scagliusi & Lockhart (2000) ont réussi à transmettre le virus de plantes malades à des plantes saines et à reproduire les symptômes de la maladie, ce qui suggère fortement que le SCYLV est l'agent causal de la feuille jaune. Le génome du SCYLV code pour au moins 6 ORFs (ORFs 0-5) et 3 régions non traduites ou UTRs qui sont situées aux extrémités 5' et 3' terminales, et dans une région intergénique (entre les ORFs 2 et 3) (Figure 10). Ces dernières sont supposées contenir en particulier les signaux de répllication du génome et de traduction des ORFs (Wang *et al.*, 1997 ; Wu et White,

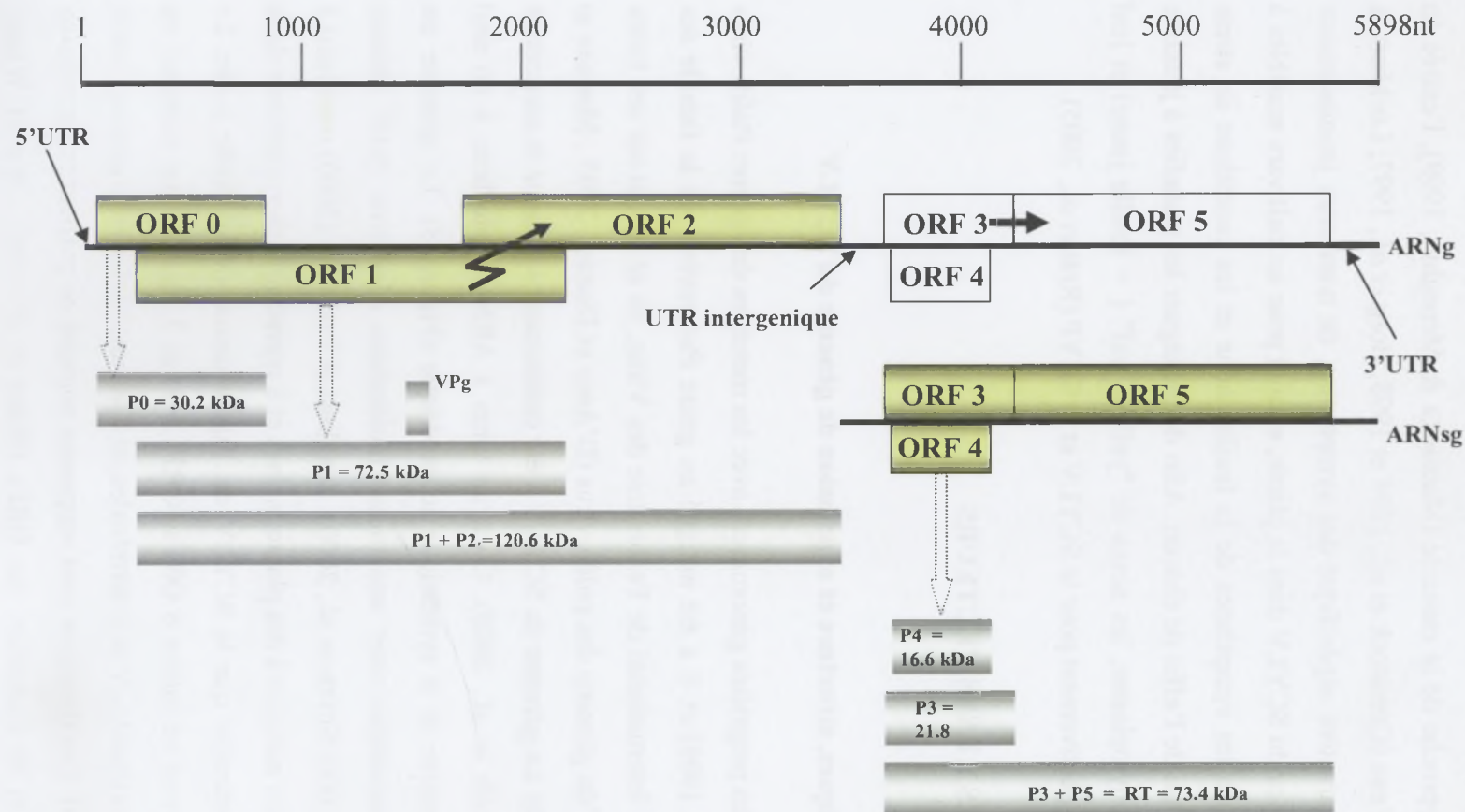


Figure 10 : Organisation du génome du SCYLIV. Les ORFs traduites à partir de l'ARN génomique (ARNg) ou de l'ARN subgénomique (ARNsg) sont indiqués sous forme de boîtes jaunes. Les protéines codées par ces ORFs sont indiquées sous forme de boîtes grises sur lesquelles sont inscrites les poids moléculaires correspondants. UTR : région non traduite ; P0 : suppresseur de RNA silencing ; P1 : protéine multifonctionnelle (sérine protéase, VPg) ; P1+P2 : ARN polymérase ARN-dépendante (RpRd) ; P3 : protéine de capsid ; P4 : protéine de mouvement et P3+P5 : protéine probablement impliquée dans la transmission par vecteur (D'après Moonan *et al.*, 2000 et Smith *et al.*, 2000).

1999 ; Shen & Miller 2004; Sanfaçon, 2005). Des fonctions ont par ailleurs été attribuées aux protéines codées par le génome du SCYLV, et leur masse moléculaire a été estimée (Tableau 1).

Les ORFs 0, 1 et 2 sont exprimés par traduction directe de l'ARN génomique (ARNg). Par analogie aux autres membres de la famille *Luteoviridae*, la fonction du peptide codé par l'ORF 0 a été reliée à l'expression des symptômes (van der Wilk *et al.*, 1997) et à l'accumulation du virus dans la plante (Sadowy *et al.*, 2001). Très récemment, le rôle de ce peptide a été précisé quand Mangwende *et al.* (2005) ont montré qu'il était indispensable et qu'il avait un rôle de suppresseur du "*posttranscriptional gene silencing*" (PTGS) chez le SCYLV ainsi que chez trois autres polérovirus : le *Beet western yellows virus* (BWYV), le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV), et le *Potato leafroll virus* (PLRV) (Pfeffer *et al.*, 2002).

L'information génétique du SCYLV est particulièrement condensée, puisque 26% du génome consiste en des chevauchements de cadres ouverts de lecture (ORFs), c'est-à-dire en des régions supportant une double information génétique, grâce à des décalages entre cadres de lecture. Le changement de cadre de lecture a lieu en amont du codon stop de l'ORF 1. Les ORFs 1 et 2 sont traduits ensemble et codent pour un peptide multifonctionnel et une ARN-polymérase-ARN dépendant (RdRp), respectivement. La séquence peptidique codée par l'ORF 1 inclut la séquence de deux motifs ; une protéinase à sérine et une protéine virale (VPg) putative reliée au génome. Il semblerait que le peptide VPg soit mûré à partir du peptide multifonctionnel par clivage protéolytique puis fixé de façon covalente à l'extrémité 5' du génome de SCYLV, comme chez les membres du genre *Polerovirus* (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). L'ORF 2 est traduit par le frameshift d'ORF 1 et les protéines P1 et P2 ont ainsi la même partie N-terminale de 497 acides aminés. Les ORFs 3, 4 et 5 sont exprimés par la traduction d'un ARN sub-génomique (sgARN1) situé en 3' de l'ARNg. L'ORF 3 code pour la protéine de capsid (CP) ou P3, responsable de l'accumulation du BWYV dans les protoplastes et dans la transmission par les pucerons (Brault *et al.*, 2003). L'ORF 4 code pour la protéine de mouvement P17 (MP) (Miller & Rasochova, 1997), tandis que le peptide codé par l'ORF 5 est la protéine de translecture RTP « Read-through protein ». Cette dernière protéine est produite via un translecteur traductionnel du peptide qui est codé par l'ORF 3 et qui pourrait être relié à la transmission du virus par les pucerons (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). La partie C-terminale de l'ORF 5 ou readthrough domain (RTD) est divergente, et la protéine de translecture (RT) chez le BWYV et les autres *Luteovirus* est clivée pendant la purification

Tableau 1 : Caractéristiques des ORFs et masse moléculaire de leurs protéines (kDa) chez les trois genres de *Luteoviridae* et le SCYLV (d'après Bork et Gibson, 1996 ; Demeler, 1996 ; Altschul *et al.*, 1997 ; Mangwende *et al.*, 2005, Stevens *et al.*, 2005)

ORFs	Position dans le génome du SCYLV	Homologue le plus proche	Masse moléculaire chez les (ou le)			Fonction du produit
			<i>Luteovirus</i>	<i>Polerovirus</i> (SCYLV)	<i>Enamovirus</i>	
0	67-837	ORF0 BWYV	ORF absent	28-30 (30,2)	34	Protéine associée à la membrane, ou suppresseur de PTGS (RNA silencing), accumulation du virus dans la plante Facteur de Réplication, symptômes
1	242-2194	ORF1 PLRV	39-42	66-72 (72,5)	84	Motifs hélicase chez les <i>Luteovirus</i> ; Protéase et VPg chez les <i>Polerovirus</i>
2 ^a	1735-3453	ORF2 PLRV	60-62	65-72 (64,4)	67	RNA-polymérase RNA-dépendante (RdRp) Réplication
1+2 ^b	242-3453	-	94-99	(120.6)	94	
3	3648-4238	ORF3 BYDV-PAV	22-23	22-23 (21,8)	21	Protéine de capsid (CP)
4	3679-4131	ORF4 BYDV-PAV	16-21	17-21 (16,6)	ORF absent	Probable protéine de mouvement (MP)
5	4239-5678	ORF5 PEMV-1	43-59	50-56 (52,1)	29-33	Assemblage des particules virales Protéine impliquée dans la transmission par puceron, ou facteur de stabilité des particules virales, protéine de translecture (RT), transport systémique, symptômes
3+5 ^c	3648-5678	Non testé	72-74	(73.4)	54	
6	-	-	6	7-9 (absent)	ORF absent	Inconnue

^a de codon stop à codon stop

^b protéine de fusion de frame-shift

^c protéine de fusion de translecture

de virus pour produire une partie C-terminale tronquée de 53 kDa (Brault *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1995). Les études sérologiques de différents membres des *Luteoviridae* ont vérifié la présence du protéine P5 (codé de l'ORF 5) exposé sur la surface de la capside virale (McGrath *et al.*, 1996 ; van den Heuvel *et al.*, 1997).

3.2. Structure des virions

Les particules virales du SCYLV ont une structure icosaédrique et une forme isométrique d'un diamètre de 24 à 29 nm avec une densité de 1,30g/cm³ dans du Cs₂SO₄ (Scagliusi & Lockhart, 2000) (Figure 8 : A et B). Les virions de la famille des *Luteoviridae* se composent d'au moins 180 sous-unités de la protéine de capside organisées dans une symétrie T = 3 (Harrison, 1999), avec ce qui semble être de petites projections à leur surface (Harrison, 1984) qui correspondent vraisemblablement au RTD ou domaine de translecture « Read-through domain » codé par l'ORF 5 (Bahner *et al.*, 1990). En comparant les séquences de la protéine de capside du SCYLV avec celles obtenues pour le PLRV, la structure secondaire du SCYLV a été définie et celle-ci montre une grande similarité avec celle du PLRV qui a une partie de sa protéine constituée de blocs en feuillets β (Torrance, 1992; Mayo & Ziegler-Graff, 1996; Wang *et al.*, 2005).

Les deux épitopes majeurs hautement antigéniques identifiés chez le SCYLV (Wang *et al.*, 2005) sont localisés dans la même région générale que celle des épitopes antigéniques du PLRV. Il est intéressant de noter que les prédictions de structure de la capside de genre *Polerovirus* révèlent un bloc conservé de résidus acides, localisés au centre des trimères de la protéine de capside constituant chacune des facettes de l'icosaèdre. Cette zone, accessible à la surface de la capside, contient notamment un épitope (Terradot *et al.*, 2001). La purification de ces particules virales est très difficile car elles sont restreintes et localisées dans les cytoplasmes des cellules compagnes des vaisseaux du phloème (Figure 11 et 12) (Schenck *et al.*, 1997 ; Vega *et al.*, 1997). La protéine de capside du SCYLV a une masse moléculaire relative de 27 kDa et elle est non glycosylée (Scagliusi & Lockhart, 2000). Elle possède deux domaines principaux, la région de R (située à la partie N-terminale de la protéine), et une région de S qui comprend le cadre principal de la structure (Terradot *et al.*, 2001).

3.3. Caractéristiques sérologiques

Le SCYLV présente des relations sérologiques partielles avec des antisérums préparés contre le *Barley yellow dwarf virus* BYDV-PAV et le CYDV-RPV (Scagliusi & Lockhart, 2000; Vega *et al.*, 1997). Des réactions immunologiques positives ont été observées dans les cellules du phloème en utilisant la technique des empreintes de sections de nervure foliaire

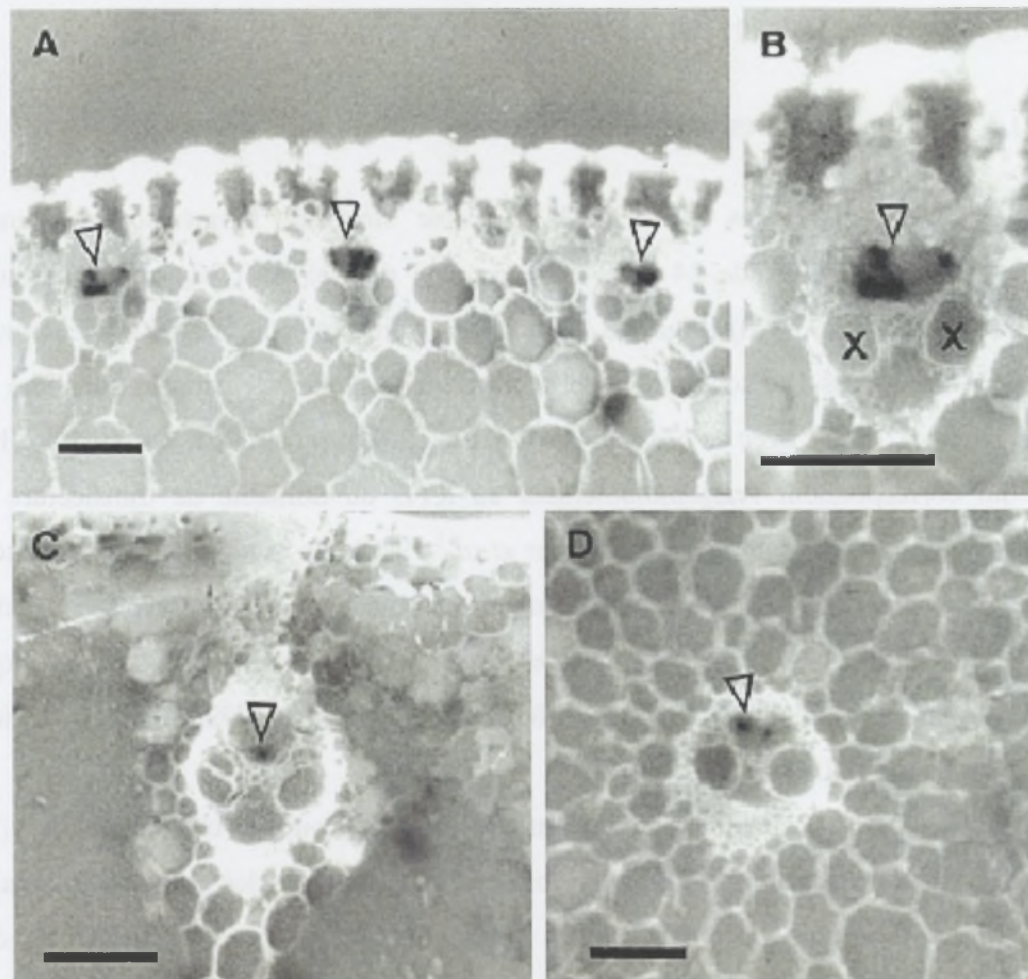


Figure 11 : Visualisation à l'aide d'un microscope binoculaire des membranes de nitrocellulose traitées par la technique TBIA "Tissue blot immunoassay" en utilisant l'antisérum contre le *Barley yellow dwarf virus* serotype PAV (BYDV-PAV). Des précipités (autour de flèches) apparaissent dans le phloème (A et B) de la nervure foliaire centrale, (C) gaine de feuille, et (D) tige. Echelle = 200 μ m (reproduit de Vega *et al.*, 1997).

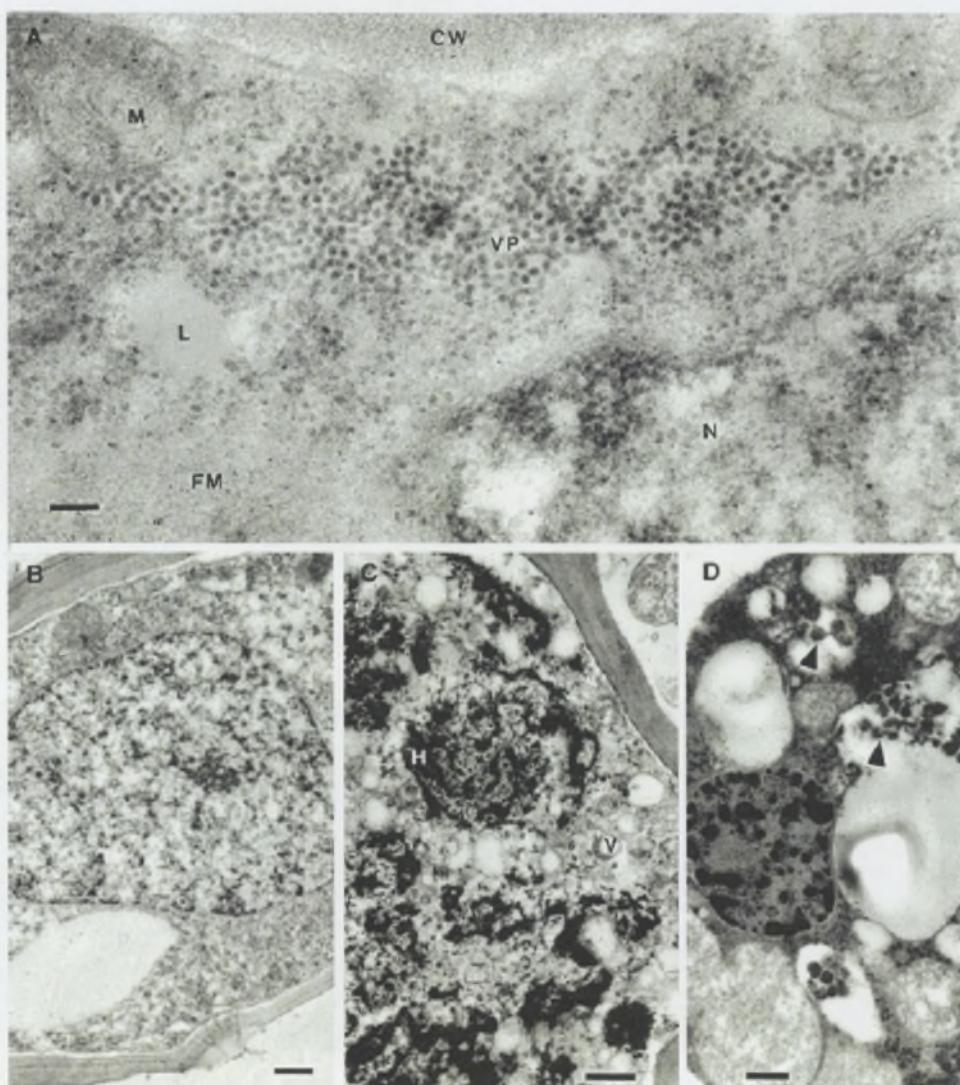


Figure 12 : Sections ultrafines en microscopie électronique des cellules compagnes du phloème de canne à sucre infectée par le SCYL (A) Particules virales "VP" dans le cytoplasme présentant des gouttelettes lipidiques L et une accumulation du matériel fibrillaire "FM". "CW" : paroi cellulaire, "N" : noyau, et "M" mitochondrie: échelle = 100 nm. (B) Cellule compagne saine d'une canne à sucre sans symptômes. (C et D) Echantillons de canne à sucre présentant des symptômes de la feuille jaune. (C) Cellule montrant une rupture de l'enveloppe nucléaire et une augmentation de la densité d'hétérochromosomes "H"; cependant de nombreuses vésicules limitées aux membranes "V" sont présentes dans le cytoplasme. (D) Noyaux condensés et cytoplasme observés dans les cellules compagnes, échelle = 500 nm de B à D. (reproduit de Vega *et al.*, 1997).

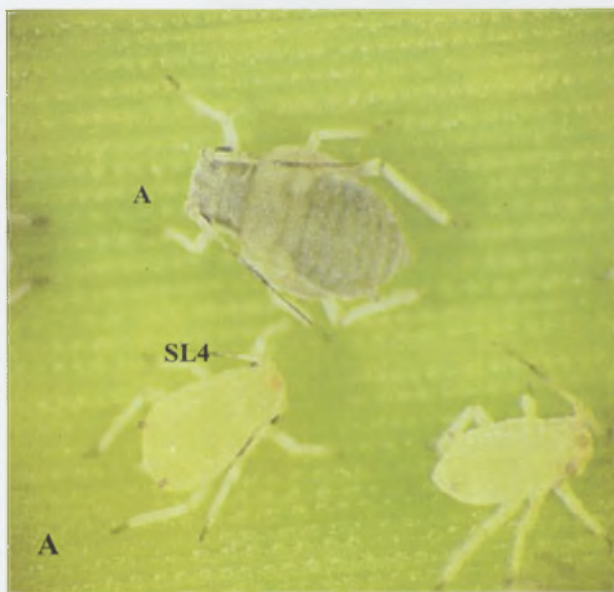


Planche 2 : (A et B) Différents stades du puceron *Melanaphis sacchari* : adulte Ad, stades larvaires SL2, SL3 et SL4 ; (C) Colonie de *M. sacchari* sur une feuille de canne à sucre (photos Y. Abu Ahmad).

centrale sur des membranes de nitrocellulose (Vega *et al.*, 1997). Ces résultats positifs ont été obtenus avec des plantes infectées par SCYLV mais pas avec des plantes saines. Différents antisérums spécifiques au SCYLV ont été obtenus à partir de virus purifié (Scagliusi & Lockhart, 1997 ; Comstock *et al.*, 1998) mais aussi à l'aide des petits peptides (14 acides aminés) identifiés à la surface de la protéine de capsid et dont les gènes ont été clonés (Wang *et al.*, 2005) ou à l'aide de la protéine de capsid et la protéine de translecture (ORFs 3 et 5) dont l'ensemble des gènes a aussi été cloné (Korimbocus *et al.*, 2002b)

3.4. La gamme d'hôtes et les vecteurs du SCYLV

La canne à sucre (*Saccharum* spp.) et les espèces apparentées sont les seules plantes hôtes connues du SCYLV en conditions naturelles. Une enquête a été réalisée à Hawaï et le SCYLV a été détecté dans les espèces *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum* et *S. sinensis*. Par ailleurs, le virus n'a pas été détecté dans les hybrides de *Miscantus* ou dans les espèces du genre *Erianthus* (une seule plante sur 100 testées était infectée par le SCYLV) chez 19 espèces d'*Erianthus* (Schenck & Lehrer, 2000). Le SCYLV, comme tous les virus de la famille des *Luteoviridae*, n'est pas transmissible par voie mécanique (Smith & Barker, 1999). Il est principalement disséminé par la plantation de boutures infectées (Lockhart et Cronjé, 2000 ; Lehrer *et al.*, 2001 ; Schenck & Lehrer, 2000 ; Scagliusi & Lockhart, 2000), et sa transmission à des plantes saines est assurée par l'intermédiaire d'insectes vecteurs. La propagation du virus peut être extrêmement rapide en fonction de l'efficacité des insectes vecteurs (Schenck & Lehrer, 2000). Des études de transmission du virus avec plusieurs espèces de pucerons ont montré que *Melanaphis sacchari* (Planche 2) était un vecteur très efficace pour transmettre le virus de cannes malades à des cannes saines, alors que *Rhopalosiphum maidis* et *R. rufiabdominalis* l'étaient peu. La transmission par *Sipha flava* et *Hysteroneura setariae* n'a pas été possible (Schenck & Lehrer, 2000 ; Scagliusi & Lockhart, 2000). Le virus a été transmis artificiellement avec succès via *M. sacchari* au blé, à l'orge et à l'avoine (plus de 90% des plantes inoculées étaient infectées), mais difficilement au riz et au maïs (8,5% et 10,5% des plantes inoculées étaient infectées respectivement) (Schenck & Lehrer, 2000).

3.5. Histologie et physiopathologie

Les particules virales du SCYLV sont accumulées dans le cytoplasme des cellules compagnes du phloème dans les plantes infectées par le virus et présentant ou non des symptômes de la feuille jaune (Vega *et al.*, 1997 ; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002). Les

analyses de microscopie en épifluorescence ont permis de montrer une accumulation de fluorescence dans les faisceaux infectés à l'intérieur du phloème où le SCYLV est localisé. De plus, une augmentation significative de l'activité syringaldazine peroxydase (SPX) a été trouvée seulement dans le phloème, dans l'épiderme et dans les cellules subépidermiques des variétés sensibles infectées par SCYLV. Cependant, dans les variétés tolérantes présentant beaucoup de faisceaux vasculaires infectés, l'activité SPX est faible et parfois nulle et le matériel fluorescent n'y est pas détecté. Certaines variétés sensibles peuvent présenter peu de faisceaux vasculaires infectés mais une importante accumulation de matériel fluorescent et une activité SPX élevée. Cette réponse correspond peut-être à l'activation des mécanismes de défense qui limitent la diffusion du virus dans la plante, mais ces mécanismes déclenchent aussi un processus qui est nocif à la canne à sucre en induisant un jaunissement et une réduction de croissance (Benatti, 2004).

Par ailleurs, l'infection de la canne à sucre par le SCYLV provoque des changements au niveau de la photosynthèse. L'analyse de la chlorophylle *a* et des échanges gazeux dans des cannes saines et des cannes infectées a montré une réduction de l'efficacité potentielle du quantum pour la photochimie du photosystème (PSII) et des changements dans le remplissage du groupe plastoquinone (PQ) dans les cannes infectées (Gonçalves *et al.*, 2005b). Une réduction de taux net d'échange de CO₂ (probablement par suite du rendement du quantum altéré) a aussi été observée, ainsi que des réductions des teneurs en pigments photosynthétiques dans les feuilles, une modification du rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* (*chl a/chl b*) et une augmentation de la teneur en hydrates de carbone, de glucanes et d' α -amino-N (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002 ; Gonçalves *et al.*, 2005b).

3.6. Impact du SCYLV sur le rendement

Des pertes significatives de rendement ont été attribuées au SCYLV dans plusieurs pays, particulièrement au Brésil et en Colombie. Des pertes du rendement potentielles de 37%, une réduction de 28% du poids des tiges, et une diminution de 11% de richesse en sucre ont été rapportées pour la variété R577 à la Réunion (Rassaby *et al.* 2003). Le virus peut infecter toutes les parties de la plante: (feuilles, tige principale, talles et même les racines (Rassaby *et al.*, 2004). L'incidence du SCYLV dans les champs commerciaux peut atteindre 100% dans les cultivars sensibles (Comstock *et al.*, 2001 et 1999 ; Viswanathan, 2002 ; Rassaby *et al.*, 2004), et la maladie peut causer des pertes significatives de rendement dans les cultivars sensibles sans que des symptômes de la maladie soient visibles. Il a été démontré que le SCYLV peut provoquer une baisse progressive et significative de diverses composantes du rendement et de

la richesse en sucre d'un cycle de récolte à l'autre (Grisham *et al.*, 2001 ; Rassaby *et al.*, 2003). La qualité de jus (brix, pol, fibres, pureté) n'est généralement pas affectée, mais le nombre de tiges par touffe ainsi que le tonnage peut être réduit.

3.7. Dynamique du SCYLV au champ et dans la plante de canne à sucre

Le taux d'infection des variétés de canne à sucre par le SCYLV est variable selon les zones de culture. À la Réunion, au cours d'une enquête menée de 2001 à 2003, le taux d'infection était relativement stable au cours du temps (Rassaby *et al.*, 2004). La relative stabilité des taux d'infection à la Réunion a été attribuée à une propagation de la maladie surtout par la plantation de boutures infectées et non à la dissémination du virus par les insectes vecteurs (Rassaby *et al.*, 2004). Ces résultats sont différents de ceux obtenus en Floride ou à Hawaii où la dissémination du SCYLV est rapide grâce à la dissémination par insectes vecteurs. Dans ces zones géographiques, du matériel végétal sain a été infecté par le virus en moins de trois mois après la plantation au champ (Schenck & Lehrer, 2000). De plus, les taux d'infection ont ensuite rapidement augmenté pour atteindre 46% au bout de 4 mois. Ces contaminations étaient bien dues à des pucerons car les plantes étudiées provenaient de culture de tissus sains ou de graines de canne à sucre (Comstock *et al.*, 1998 ; Schenck & Lehrer, 2000).

La répartition du SCYLV *in planta* est généralement systémique, mais le virus est parfois détecté dans les feuilles et pas dans les tiges et vice-versa (Daugrois *et al.*, 2000). Quinze jours après de la germination de boutures infectées par SCYLV, le virus avait une répartition systémique uniforme dans les jeunes pousses des cultivars R570, R575, R577 et R579 à La Réunion. Lorsque la canne à sucre était infectée par le SCYLV, ce dernier a été détecté dans tous les organes de la plante : ensemble du feuillage, tiges et même les racines. La distribution du virus est presque identique dans la plante pendant toute la période de croissance de la canne à sucre (Rassaby *et al.*, 2004).

3.8. Épidémiologie du SCYLV

Le déroulement d'un cycle épidémiologique chez le SCYLV comme chez les autres membres de la famille des *Luteoviridae* est sous la dépendance d'un ensemble complexe de facteurs abiotiques et biotiques (Robert & Lemaire, 1999). À la Réunion, il a été démontré que les talles de canne à sucre infectés après deux mois de croissance au champ étaient toujours

localisées autour des touffes déjà colonisées par le virus (Rassaby *et al.*, 2001 et 2004). Cette caractéristique permet d'expliquer que la dissémination du SCYLV a lieu à partir de foyers d'infection primaires et que les infections suivantes correspondent à des infections secondaires à partir des foyers primaires. L'épidémie secondaire résulte des populations de pucerons (principalement des aptères) qui colonisent la culture en se déplaçant sur de courtes distances de plante à plante. En effet, quand un puceron décide de s'installer sur une plante, il va majoritairement donner naissance à des individus aptères et se déplacer de plante à plante sur une très courte distance (Robert & Lemaire, 1999). Ce n'est que lorsque la population devient trop importante que les formes ailées réapparaissent et que les pucerons quittent la colonie et la zone infestée pour s'établir ailleurs. Les populations régressent alors rapidement pour disparaître complètement au bout de deux mois environ (Bouchery, 1977). En Floride et à Hawaii, des plants de canne à sucre sains issus de culture de tissus ou de graines ont été rapidement infectés par le SCYLV (Comstock *et al.*, 1998 ; Schenck & Lehrer, 2000). A Hawaii, 46% des plantes étaient infectées par le virus quatre mois après la plantation (Schenck & Lehrer, 2000), et une fois la maladie présente dans la parcelle de canne à sucre, celle-ci se propageait très lentement et la vitesse de propagation du SCYLV d'une plante à l'autre a été estimée à 5 m par an maximum (Lehrer *et al.*, 2001).

3.9. Résistance au SCYLV

La résistance au SCYLV varie en fonction des espèces de *Saccharum*. Les clones de *Saccharum spontaneum* sont plus résistants au SCYLV (7% d'incidence) que les clones de *S. officinarum* et *S. robustum* (76% et 63% d'incidence respectivement) (Comstock *et al.*, 2001). Parmi les hybrides interspécifiques, certains cultivars sont très sensibles à la maladie comme SP71-6163 au Brésil (Lockhart & Cronjé, 2000), H50-7209, H65-7205 et H73-6110 au Pérou et à Hawaii (Alegria *et al.*, 2000 ; Schenck & Lehrer, 2000). Il existe aussi des cultivars résistants car le SCYLV n'y a jamais détecté alors qu'ils étaient cultivés à proximité d'autres cultivars très infectés et que les insectes vecteurs étaient présents. C'est le cas de M1176/77 à Maurice (Moutia & Saumtally, 1999), CP57-603 et CP89-1509 en Floride (Comstock *et al.*, 1998 et 1999), ou encore les variétés H87-4319 et H78-7750 à Hawaii (Schenck et Lehrer, 2000). En Afrique du sud, la variété N25 est immune au SCYLV alors que la variété N32 peut être infectée à 100% (Rutherford, 2006). En Colombie, il a été montré que le croisement entre le parent femelle sensible CC84-75 et le parent résistant RD75-11 produit une descendance résistante (Victoria *et al.*, 2005).

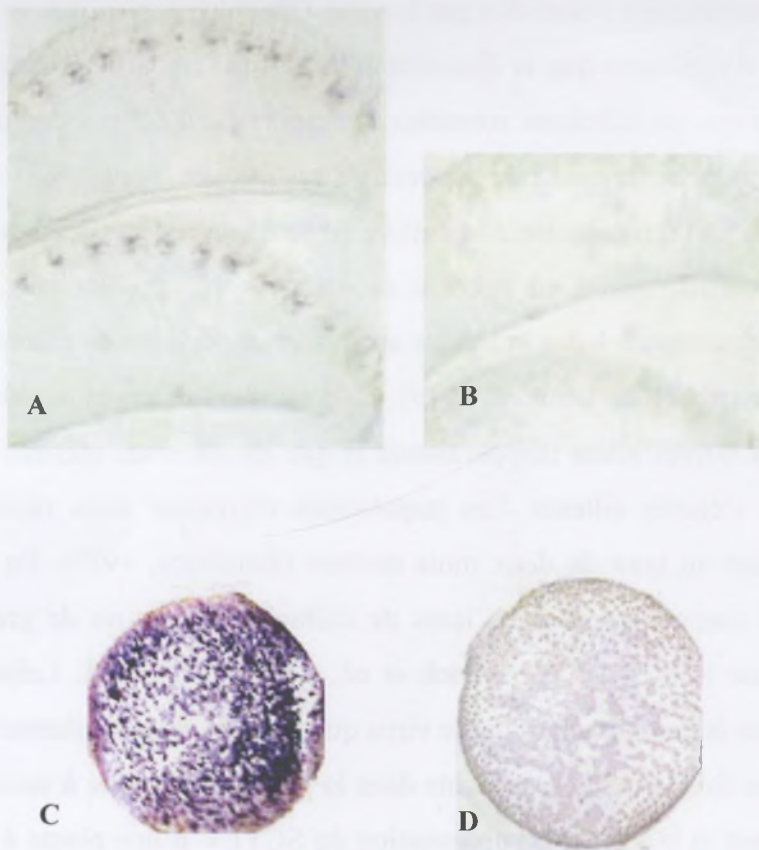


Figure 13 : Détection du SCYLV par TBIA "Tissue blot immuno-assay". (A) Section transversale de la nervure centrale d'une feuille de canne à sucre infectée. La coloration violette dans le phloème permet de visualiser la réaction antigène-anticorps. (B) Section transversale de la nervure centrale d'une feuille saine de canne à sucre (photo de M. Fitch). (C) Section transversale d'une tige de la canne à sucre infectée. (D) Section transversale d'une tige de canne à sucre saine (photos de Y. Abu Ahmad).

localisées autour des touffes déjà colonisées par le virus (Rassaby *et al.*, 2001 et 2004). Cette caractéristique permet d'expliquer que la dissémination du SCYLV a lieu à partir de foyers d'infection primaires et que les infections suivantes correspondent à des infections secondaires à partir des foyers primaires. L'épidémie secondaire résulte des populations de pucerons (principalement des aptères) qui colonisent la culture en se déplaçant sur de courtes distances de plante à plante. En effet, quand un puceron décide de s'installer sur une plante, il va majoritairement donner naissance à des individus aptères et se déplacer de plante à plante sur une très courte distance (Robert & Lemaire, 1999). Ce n'est que lorsque la population devient trop importante que les formes ailées réapparaissent et que les pucerons quittent la colonie et la zone infestée pour s'établir ailleurs. Les populations régressent alors rapidement pour disparaître complètement au bout de deux mois environ (Bouchery, 1977). En Floride et à Hawaïi, des plants de canne à sucre sains issus de culture de tissus ou de graines ont été rapidement infectés par le SCYLV (Comstock *et al.*, 1998 ; Schenck & Lehrer, 2000). A Hawaïi, 46% des plantes étaient infectées par le virus quatre mois après la plantation (Schenck & Lehrer, 2000), et une fois la maladie présente dans la parcelle de canne à sucre, celle-ci se propageait très lentement et la vitesse de propagation du SCYLV d'une plante à l'autre a été estimée à 5 m par an maximum (Lehrer *et al.*, 2001).

3.9. Résistance au SCYLV

La résistance au SCYLV varie en fonction des espèces de *Saccharum*. Les clones de *Saccharum spontaneum* sont plus résistants au SCYLV (7% d'incidence) que les clones de *S. officinarum* et *S. robustum* (76% et 63% d'incidence respectivement) (Comstock *et al.*, 2001). Parmi les hybrides interspécifiques, certains cultivars sont très sensibles à la maladie comme SP71-6163 au Brésil (Lockhart & Cronjé, 2000), H50-7209, H65-7205 et H73-6110 au Pérou et à Hawaïi (Alegria *et al.*, 2000 ; Schenck & Lehrer, 2000). Il existe aussi des cultivars résistants car le SCYLV n'y a jamais détecté alors qu'ils étaient cultivés à proximité d'autres cultivars très infectés et que les insectes vecteurs étaient présents. C'est le cas de M1176/77 à Maurice (Moutia & Saumtally, 1999), CP57-603 et CP89-1509 en Floride (Comstock *et al.*, 1998 et 1999), ou encore les variétés H87-4319 et H78-7750 à Hawaïi (Schenck et Lehrer, 2000). En Afrique du sud, la variété N25 est immune au SCYLV alors que la variété N32 peut être infectée à 100% (Rutherford, 2006). En Colombie, il a été montré que le croisement entre le parent femelle sensible CC84-75 et le parent résistant RD75-11 produit une descendance résistante (Victoria *et al.*, 2005).

Les taux d'infection des cultivars de canne à sucre seraient différents en fonction des parents d'origine, et surtout du parent femelle utilisé lors du croisement. En effet, il semblerait que les clones dont les taux d'infection sont faibles ont aussi des ancêtre communs (Comstock *et al.*, 1999). Des marqueurs moléculaires ont récemment été associés à la résistance de la canne à sucre au SCYLV et trois marqueurs microsatellites sur 390 ont été identifiés (Comstock *et al.*, 2004). Une analyse de ségrégation réalisée avec 47 descendants a permis de montrer que deux de ces marqueurs étaient liés, mais qu'ils étaient différents du troisième. Ces résultats suggèrent que des gènes multiples sont impliqués dans la résistance de la canne à sucre au SCYLV (Comstock *et al.*, 2004).

3.10. Diagnostic du SCYLV

Le SCYLV peut être diagnostiqué ou détecté par plusieurs méthodes. La microscopie électronique et notamment "l'Immunosorbent Electron Microscopy" (ISEM) a permis de montrer que le SCYLV était associé à la maladie de la feuille jaune (Lockhart *et al.*, 1996 ; Vega *et al.* 1997; Scagliusi et Lockhart, 2000). Des méthodes sérologiques ont ensuite été développées pour le diagnostic de routine en utilisant un anticorps polyclonal (Scagliusi et Lockhart, 1997 et 2000) ou un anticorps monoclonal (Korimbocus *et al.*, 2002a ; Wang *et al.*, 2005). La méthode ELISA ou DAS-ELISA et la méthode des taches ou TBIA (Tissue Blot Immunosorbent Assay) sur membrane de nitrocellulose (Chatenet *et al.*, 2001, Rassaby *et al.*, 2004, Scagliusi and Lockhart, 2000) ont été utilisées avec succès (Figure 13). Cette dernière méthode est actuellement la plus utilisée pour le dépistage du SCYLV (Schenck *et al.*, 1997 ; Cronjé et Bailey, 1999). Des techniques de biologie moléculaire comme la RT-PCR ont aussi été mises au point pour le diagnostic du SCYLV (Irey *et al.*, 1997 ; Comstock *et al.*, 1998 ; Gonçalves *et al.*, 2002) ou par la RT-PCR à fluorescence en temps réel utilisée dans des programmes de production de matériel végétal indemne de virus (Korimbocus *et al.*, 2002b).

3.11. Méthodes de lutte contre le SCYLV

Pour lutter contre le SCYLV, plusieurs traitements dont la thérapie à l'eau chaude ont été explorés dans divers pays. Cette dernière est cependant inefficace pour éliminer le SCYLV dans les boutures contaminées (Chatenet *et al.*, 2001 ; Moutia & Saumtally, 2001 ; Saumtally, 2001 ; Comstock & Miller, 2004 ; Flynn *et al.*, 2005). La seule voie prometteuse pour lutter contre cette maladie reste actuellement l'assainissement par culture de tissu (Parmessur & Dookun, 2000 ; Chatenet *et al.*, 2001 ; Fitch *et al.*, 2001 ; Chriki *et al.*, 2003).

La culture de cals issus de tissus de feuilles enroulées (Fitch *et al.*, 2001) et la culture de méristèmes (Delage *et al.*, 1999 ; Chatenet *et al.*, 2001) permet des taux d'assainissement très importants (de 90 à 100%). Cependant, le passage des ressources génétiques de canne à sucre par la culture de tissu est un processus long et coûteux qui peut seulement être justifié s'il y a un risque d'introduire de nouvelles souches de l'agent pathogène dans une région déjà contaminée. A plus long terme, la résistance variétale apparaît donc comme le moyen le plus efficace pour lutter contre la maladie.

4. LES ENJEUX

Depuis sa découverte à la fin des années 1980, la maladie de la feuille jaune causée par le SCYLV a fait l'objet de nombreuses recherches. Ces recherches ont permis de faire des avancées significatives dans la connaissance de la maladie, son agent causal ainsi que sur les méthodes de lutte. Etant donnée l'apparition récente de la feuille jaune et son impact sur la culture de la canne à sucre, cette maladie a des enjeux à la fois sur le plan agronomique et sur le plan scientifique

4.1. Enjeu agronomique

La culture de la canne à sucre représente un enjeu socio-économique considérable au niveau mondial, et notamment à l'île de la Réunion et en Guadeloupe où elle constitue l'une des principales activités agricoles. Une partie de ce travail y a été réalisée. Cet enjeu exige la recherche de production à haut rendement et conduit à une pratique généralisée de monocultures intensives. La monoculture intensive de la canne à sucre sur de grandes surfaces favorise le développement d'épidémies.

Étant donné que la maladie de la feuille jaune est présente dans la majorité des aires de culture de la canne à sucre, elle peut être à l'origine d'importantes baisses de rendement. Les seuls moyens de lutte sont préventifs. Ils impliquent des techniques de multiplication et de distribution des plantes parfaitement contrôlées et une sélection sévère des nouvelles variétés conduisant à la plantation de variétés résistantes. Le travail présenté dans cette thèse représente un effort de recherche sur la connaissance de la diversité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène de l'agent pathogène. Cette connaissance est essentielle pour une application efficace de ces méthodes de lutte.

4.2. Enjeu scientifique

L'ensemble des gènes des virus végétaux joue potentiellement un rôle clé au cours des interactions plantes-microorganismes et notamment les gènes intervenant dans la réplication du virus, son mouvement ou son encapsidation. Certains gènes sont très conservés chez une espèce ou une famille de virus, mais sont variables chez une autre. Le syndrome de la feuille jaune est la maladie de la canne à sucre la plus étudiée au cours de cette dernière décennie. Les études de Borg *et al.* (2001), de Moonan & Mirkov (2002) et de Rassaby (2001) ont clairement montré que le génome du SCYLV est très variable et l'existence de différents génotypes de SCYLV, voire de différentes souches ou pathotypes de ce virus, est donc très probable. Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont eu pour objectif de valider cette hypothèse. Par ailleurs, la mise en évidence de différents génotypes ou pathotypes de SCYLV pourrait conférer à la feuille jaune le statut de maladie modèle dans le cadre des études de viroses végétales. En effet, étant donné l'apparition récente de cette maladie, elle peut être considérée comme une maladie émergente. La connaissance et la caractérisation de la variabilité du SCYLV constitueraient un support fort important pour l'étude de l'évolution du virus au cours du temps.

CHAPITRE II

VARIABILITE GENETIQUE ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE DIFFERENTS GENOTYPES DU SCYLV

Résumé

Des analyses phylogénétiques ont été réalisées avec les séquences nucléotidiques du génome de 43 isolats viraux de l'île de la Réunion, de 17 isolats originaires d'autres régions dans le monde et de 11 isolats de la banque de données GenBank. Ces séquences ont été obtenues après amplification par RT-PCR de quatre fragments (A, B, C, D) couvrant 72% du génome, puis clonage et séquençage. Selon le fragment analysé, les isolats du SCYLV sont distribués dans différents groupes (clusters) phylogénétiques ou appartiennent à un seul génotype. Les différences entre les génotypes sont réparties sur tout le génome mais certaines régions du génome sont plus variables que d'autres. La majorité des isolats de l'île de la Réunion ont été groupés dans des groupes phylogénétiques qui ne contiennent pas d'isolats d'autres origines. La séquence complète des six ORFs (5612 nt) de cinq isolats de SCYLV (deux de l'île de la Réunion, un du Brésil, un de Chine, et un du Pérou) et trois isolats de GenBank a été analysée. Quatre génotypes du SCYLV ont pu être identifiés : BRA pour Brésil, CUB pour Cuba, PER pour Pérou et REU pour Réunion. Le génotype REU est un génotype particulier prédominant à la Réunion.

Par ailleurs, des amorces permettant d'identifier spécifiquement par RT-PCR trois de ces quatre génotypes de SCYLV ont été définies. Les deux génotypes BRA et PER qui sont phylogénétiquement proches n'ont pas pu être distingués par cette technique et ils ont donc été regroupés et désignés génotype BRA-PER. Le génotypage par RT-PCR de 245 isolats du SCYLV originaires de 18 pays a permis de montrer que le génotype BRA-PER est présent dans toutes les zones de culture de la canne à sucre. En revanche, les génotypes CUB et REU ont chacun été trouvés seulement dans quatre zones géographiques. Les génotypes BRA-PER, CUB et REU ont tous les trois été trouvés dans les variétés produites en Guadeloupe, ce qui indique la transmission locale de ces génotypes. En revanche, seuls les génotypes BRA-PER et CUB ont été détectés dans les variétés locales au Brésil, alors que le génotype REU y était présent dans la variété R570 importée de la Réunion. De même, les deux génotypes BRA-PER et REU étaient présents à l'île de la Réunion, mais le génotype BRA-PER n'a été trouvé que dans une variété importée du Brésil et n'a pas encore été disséminé sur l'île. Cette étude a permis de montrer que plusieurs génotypes du SCYLV peuvent coexister dans une même zone de culture, voire dans une plante. En revanche, dans certaines aires géographiques, un seul génotype ou un génotype majeur est présent.

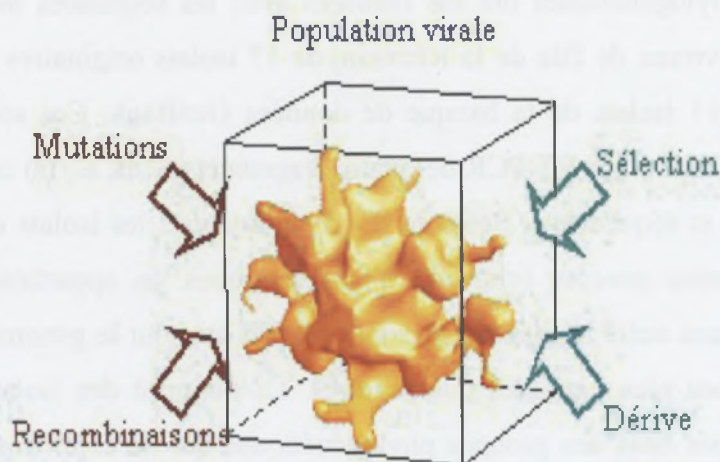


Figure 14 : Sources de la diversité génétique et de l'évolution des virus, schématisés par une quasi-espèce d'un virus à ARN. Le cube représente une simplification en trois dimensions de l'espace des séquences. Au centre du cube se trouve la séquence consensus (non nécessairement la séquence du variant le mieux adapté) de la quasi-espèce qui est formée d'un nuage (ou spectre) de mutants apparentés. Si la réplication du virus était strictement dépourvue d'erreurs, la quasi-espèce n'occuperait que le point central. Au contraire, si la réplication introduisait trop d'erreurs (au-delà d'un certain seuil, la quasi-espèce se dilaterait comme un gaz jusqu'à occuper tout l'espace, la quasi-espèce perdrait son identité. Le taux de mutations élevé des virus à ARN les rapproche du seuil tolérable d'erreurs et leur permet d'explorer un vaste espace de séquences (modifié d'après Eigen, 1993)

INTRODUCTION

Les méthodes de lutte directe utilisées contre les virus, telles que l'utilisation de vaccins et de molécules anti(retro)virales chez les animaux ou de gènes de résistance chez les plantes, ont révélé la très grande capacité d'adaptation de ces virus (Guyader & Giblot-Ducray, 2004). En effet, dans de nombreux cas, les virus se sont montrés capables d'échapper, parfois très rapidement, aux méthodes de lutte mise en place. Cette capacité d'adaptation semble corrélée à l'énorme potentiel de variation des virus à ARN (Guyader & Giblot-Ducray, 2004). Cependant, des pressions de sélection sculptent les populations virales dans leur diversité en agissant à tous les niveaux du cycle infectieux des virus : stratégies d'expression du génome et interactions avec l'hôte et le vecteur sont les principales cibles de la sélection (Guyader & Giblot-Ducray, 2004). Comme tous les génomes, les acides nucléiques viraux varient au cours du temps. Les mutations, recombinaisons, réassortiments se manifestent dans les génomes viraux avec une fréquence particulièrement élevée. Cette variabilité, loin d'être un handicap, est au contraire un atout essentiel dans la course à l'efficacité et à l'adaptabilité. Le séquençage des génomes viraux a permis de construire des groupes phylogénétiques et de voir se dessiner une évolution modulaire. Les lois qui gouvernent l'évolution du SCYLV sont les mêmes que pour l'ensemble des virus à ARN et des rétroïdes (terme regroupant les rétrovirus et les pararétrovirus): au cours de leur réplication, une variation importante est générée. Elle donne naissance à des mutants, ou plus généralement des variants, dont la distribution dans la population change avec le temps : c'est le processus d'évolution.

1. GENERATION DE LA VARIABILITE DES VIRUS A ARN

La source majeure de variation est le processus de réplication du génome au cours duquel des erreurs ont lieu. Les deux principaux types d'erreurs sont les mutations et les recombinaisons « imparfaites » (García-Arenal *et al.*, 2001), et les réassortiments génèrent l'apparition d'une grande variabilité des virus à ARN. Par ailleurs, la structure des populations, la sélection et la dérive génétique (que nous détaillerons dans le chapitre III) sont des mécanismes qui modulent la variabilité des virus (figure 14).

1.1. Les erreurs liées aux mutations : substitutions, insertions et délétions

Les mutations constituent la première force dans l'évolution des virus. Au cours de la réplication du génome des virus à ARN, sous l'action des ARN polymérases ARN-dépendantes (RpRd) qui sont codées par le génome viral, les polymérases font des erreurs ponctuelles : substitutions, insertions et délétions limitées. Ce type d'enzyme ne présente pas de système de correction des erreurs de réplication, à la différence des ADN polymérases ADN-dépendante possédant une fonction de relecture et de réparation des erreurs de synthèse (Roossink, 1997).

Le taux d'erreur ou la fréquence de substitution, qui correspond au nombre d'incorporations erronées par site nucléotidique et par cycle réplcatif, est difficilement mesurable. Selon certaines estimations, le taux de mutation des rétrovirus (et probablement des pararétrovirus) avoisine 0,1 par génome et par cycle de réplication (Drake *et al.*, 1998), et de 10^{-4} à 10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication pour les ARN polymérases (Drake & Holland, 1999). Ainsi, chaque copie d'un génome à ARN de 10 kb serait statistiquement susceptible de comporter une erreur. Autrement dit, près d'une erreur serait introduite par génome et par cycle de réplication, sachant que la taille moyenne du génome d'un virus est d'environ 10^4 nucléotides. Maplica *et al.* (2002) ont décrit la première estimation non biaisée du taux de mutations pour un phytovirus à ARN, le *Tobacco mosaic virus* (TMV). Ce taux est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication, soit 0,06 par génome répliqué. Cette valeur, qui pourrait être légèrement sous-estimée, est environ 10 fois moins élevée que la valeur moyenne observée pour les virus d'animaux, mais reste dans la gamme inférieure de ce qui est décrit pour ces derniers (Drake & Holland, 1999 ; Maplica *et al.*, 2002).

Un trait commun aux ARN polymérases (ADN-et ARN-dépendantes) est leur capacité à « dérafer » sur la matrice lors de la synthèse du brin complémentaire (Bujarski, 1999). Lorsque cela se produit et que le complexe de réplication reste sur la matrice en cours de lecture, ce processus peut conduire à une insertion ou à une délétion « indel » de courts fragments sur le brin en cours de synthèse. Les insertions peuvent conduire à la répétition d'un même motif ou à l'ajout de nucléotides avec une séquence totalement différente de la matrice copiée. Ces "indels" ont un impact biologique très important. En effet, ils peuvent provoquer un décalage dans un cadre ouvert de lecture (ORF) et ainsi induire sa terminaison précoce par création d'un codon stop ou entraîner la production d'une protéine chimère, s'il existe un ORF

chevauchant dans un cadre de lecture décalé. Certains ARN défectifs interférants (ARN produits par délétion plus ou moins importante de régions du génome d'un virus, incapables de se répliquer en l'absence du virus assistant) sont également produits par ce biais (Bujarski, 1999). Qualitativement, les conséquences évolutives de ces erreurs sont proches de celles des mutations ponctuelles car il n'y a pas d'échange d'information génétique.

1.2. Les erreurs liées aux recombinaisons

Le dérapage de la polymérase sur la matrice en cours de lecture provoque, dans certains cas, le détachement du complexe de réplication qui change de matrice durant la synthèse du brin complémentaire (Nagy & Simon, 1997). Cette erreur conduit à une molécule d'ARN hybride contenant, lors d'une recombinaison « imparfaite », des "indels" et peut donner naissance à des ARN défectifs interférants (White & Morris, 1994).

La recombinaison est donc un second mécanisme générateur de variation, mais aussi un moyen de redistribuer une variabilité existant entre deux génomes distincts. Elle peut se produire entre deux ARN viraux plus ou moins différents (provenant de souches ou d'espèces différentes) ou entre un ARN viral et un ARN non viral présent dans la cellule infectée. La fréquence et la localisation des sites de recombinaison dépendent assez souvent de l'existence de similarités de séquence (favorisant les re-appariements lors des "sauts de matrices"), et/ou de structures particulières de l'ARN comme les "boucles en épingle à cheveux" (Nagy & Simon, 1997). Cependant, il semble que le complexe de réplication lui-même puisse être plus ou moins prompt aux changements de matrice, car des mutations au sein d'un de ces composants peuvent avoir une influence sur la fréquence et le type de recombinaison (Figlerowicz *et al.*, 1997).

Actuellement, les estimations les plus fiables du taux de recombinaison ont été obtenues pour les rétrovirus, pour lesquels les mesures ont été faites en cultures cellulaires après un seul cycle de réplication, ce qui minimise l'élimination par sélection d'hybrides mal adaptés. Le taux de recombinaison a été évalué à environ 50% chez l'*Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) entre des marqueurs distants de 1 kb, soit un taux de 5×10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication. Ce taux est 10 fois plus élevé que les taux mesurés chez deux autres rétrovirus, le *Spleen necrosis virus* (SNV) et le *Murine leukemia virus* (MLV) (Rhodes *et al.*, 2003).

Chez les phytovirus, la seule estimation expérimentale du taux de recombinaison a été réalisée avec un pararétrovirus, le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Froissart *et al.*, 2005). Il

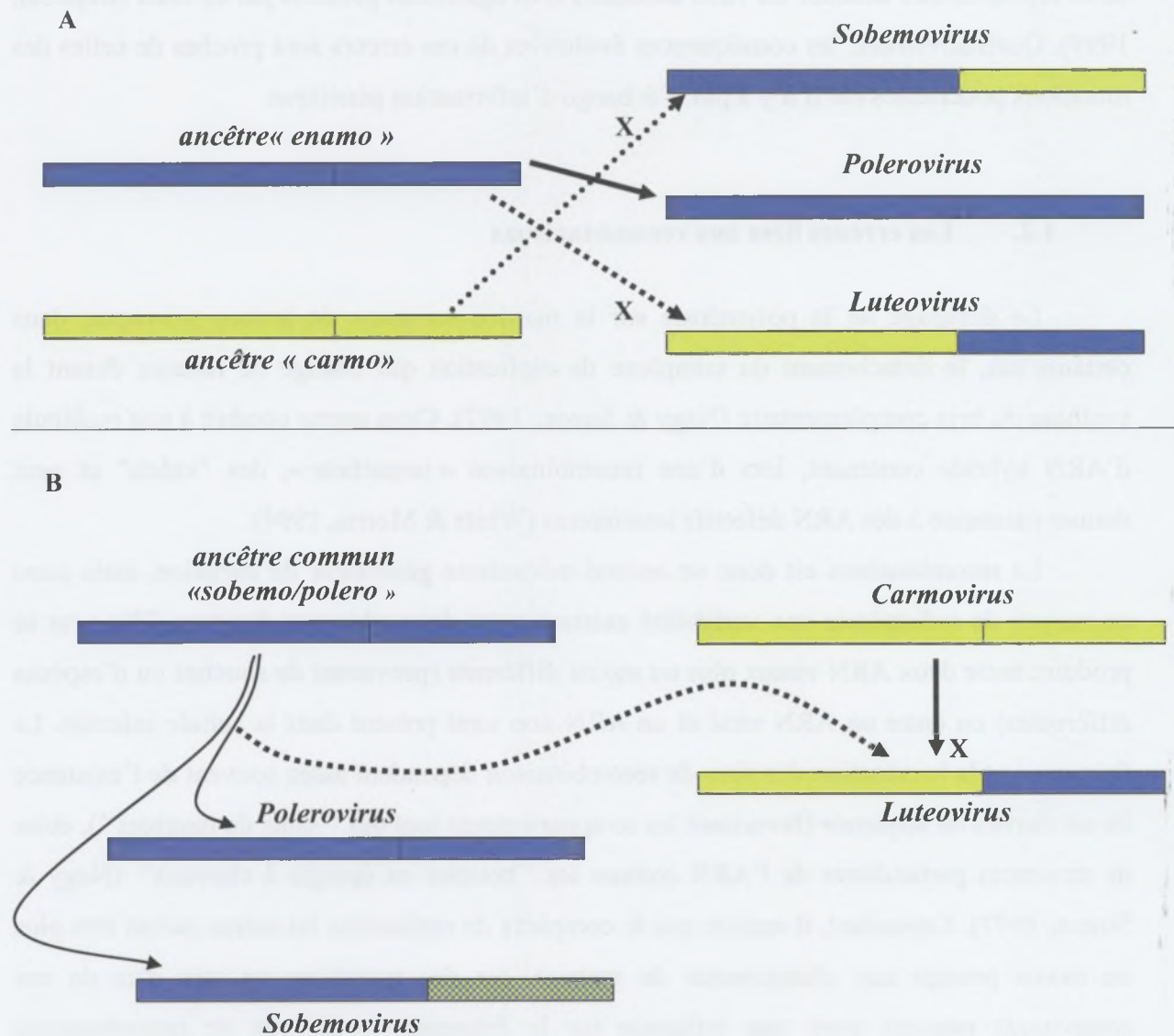


Figure 15 : Hypothèses sur l'origine des *Luteoviridae*. **A** : selon le modèle de Gibbs (1995), les *Polverovirus* descendent directement d'un ancêtre de type *Enamovirus*, alors qu'une recombinaison entre cet ancêtre et un ancêtre de type *Carmovirus* serait à l'origine des virus du genre *Sobemovirus* (qui auraient hérité du bloc de gènes 5' du premier et du bloc 3' du second) ; la recombinaison inverse entre ces mêmes ancêtres serait à l'origine des *Luteovirus*. **B** : le modèle de Terradot *et al.* (2001) propose que les virus du genre *Sobemovirus* et les virus du genre *Polverovirus* dérivent d'un même ancêtre par simple sélection, et que la recombinaison entre un ancêtre des *Polverovirus* ayant déjà divergé et un ancêtre des virus du genre *Carmovirus* serait à l'origine des virus du genre *Luteovirus*. X désigne un événement de recombinaison.

s'agit d'ailleurs de la première évaluation de ce paramètre pour un virus dans un hôte pluricellulaire et un taux élevé, compris entre 2×10^{-5} et 4×10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication, a été déterminé.

Les recombinaisons existent à l'intérieur d'une espèce, mais aussi entre espèces, genres, et familles de virus. L'étude des séquences d'isolats naturels révèle ou suggère fréquemment des exemples de recombinaisons comme chez les *Luteoviridae*, où les *Luteovirus* et les *Polerovirus* ont des génomes qui se ressemblent dans la partie 3' et qui sont très différents dans la partie 5' où se trouve la polymérase (Astier *et al.*, 2001). Il est très probable que de nombreux phénomènes de recombinaison soient à l'origine de la diversité des espèces au sein de cette famille, par échanges entre les deux blocs de gènes (Figure 15). Ainsi, le *Soybean dwarf virus* (SbDV), virus non classé dans un genre au sein des *Luteoviridae*, serait issu d'une recombinaison entre un virus proche des *Luteovirus* pour le bloc de gènes 5' et un virus proche des *Polerovirus* pour le bloc 3' (Rathjen *et al.*, 1994 ; Moonan *et al.*, 2000 ; Terauchi *et al.*, 2001). De façon similaire, Moonan *et al.* (2000) et Smith *et al.* (2000) ont montré simultanément le caractère de recombinant inter-générique du *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) qui est un virus recombinant entre trois membres de la famille des *Luteoviridae* (*Luteovirus*, *Polerovirus* et *Enamovirus*). On peut imaginer que des plantes infectées simultanément par plusieurs virus ont été le lieu de ces échanges (Moonan & Mirkov, 2002). Un modèle simple de recombinaison entre différents virus à ARN, avec les contraintes possibles, a été développé par Worobey & Holmes en 1999 (figure 16).

1.3. Les erreurs liées au réassortiment

Chez certains virus de plantes dont le génome est multipartite, des segments génomiques peuvent parfois avoir une autonomie suffisante pour être fonctionnels et être échangés entre virus plus ou moins proches. Ce phénomène est appelé réassortiment ou pseudo-recombinaison, car le résultat est le même que pour la recombinaison : il aboutit à un virus hybride. Par exemple, l'ARN3 du CMV (*Cucumber mosaic virus*) et les ARN 1 et 2 du PSV (*Peanut stunt virus*) peuvent donner en conditions naturelles un pseudo-recombinant fonctionnel (White *et al.*, 1995). Des réassortiments « illégitimes » ont déjà été observés chez certains virus, comme par exemple lors de l'apparition d'un virus quadripartite par réassortiments (et recombinaison) entre deux virus triparties (Masuta *et al.*, 1998). Dans le cas des virus A et B de la grippe (influenza A et B), les réassortiments jouent un rôle particulièrement important dans l'apparition et l'évolution de nouveaux sous-types (Hay *et al.*, 2001).

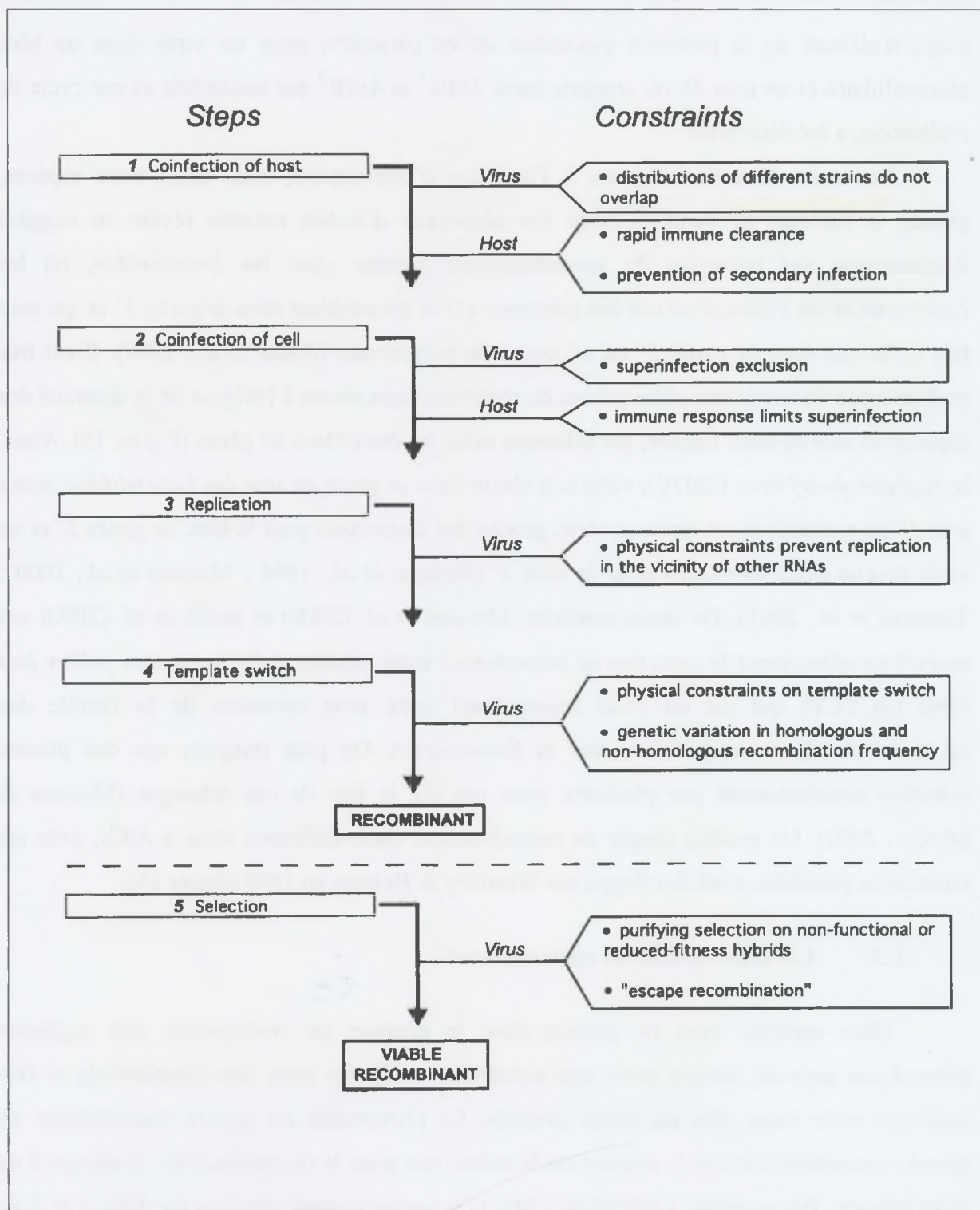


Figure 16 : Modèle de production d'un virus recombinant viable à ARN, par choix de copie, et contraintes possibles. Les étapes 1–4 sont nécessaires pour la production de n'importe quel ARN recombinant, alors que l'étape 5 doit être passée pour générer un virus compétent et répliquatif. Les contraintes du virus ou de l'hôte peuvent bloquer la recombinaison en limitant ou en prévenant la réalisation de n'importe laquelle de ces cinq étapes (reproduit à partir de Worobey et Holmes, 1999).

2. PHYLOGENIE MOLECULAIRE

La plupart des virus sont regroupés en genres et familles. Les espèces comptent de nombreuses sous-espèces, souches ou variants. La phylogénie traduit sous forme d'un schéma, les relations de proximité établies pour les caractères comparables choisis. Ce schéma est l'arbre phylogénétique qui comporte l'ancêtre (la racine) et ses descendants.

Les caractères comparables sur lesquels s'appuient les phylogénies moléculaires sont les différences dans la séquence nucléotidique ou protéique, établies le plus souvent par séquençage ou profil de restriction. La proximité peut être mesurée par la comparaison des séquences, en admettant qu'elles ont accumulé d'autant plus de différences qu'elles ont divergé depuis plus longtemps. La comparaison peut concerner un génome entier, mais plus souvent une région, un gène, un segment ou un motif fonctionnel. La proximité s'exprime par un pourcentage d'identité entre séquences nucléotidiques. Si l'on compare des séquences protéiques où les acides aminés sont équivalents à l'intérieur de leur groupe biochimique, il convient de parler de pourcentage de similarité.

La comparaison s'appuie sur un alignement des séquences homologues, en tenant compte des délétions et insertions. Chaque position de l'alignement, nucléotide ou acide aminé, est un site. Les différences mises en évidence par l'alignement des séquences sont quantifiées par deux types d'approche. Les méthodes phénotypiques établissent la similitude globale en exploitant une matrice de distance par comparaison deux à deux de tous les sites. Les méthodes cladistiques (le clade est le groupe formé par un ancêtre et tous ses descendants) ne retiennent que les sites informatifs (ceux qui présentent des différences) et interprètent ces différences selon le principe de la parcimonie maximale : en admettant que l'évolution a emprunté le chemin le plus court, le meilleur arbre sera celui qui minimise le nombre de substitutions aux sites informatifs.

Il faut aussi souligner que les alignements de séquences doivent être examinés pour y rechercher d'éventuelles recombinaisons avant de construire des arbres phylogénétiques (Worobey & Holmes, 1999). Les arbres les plus robustes concernent souvent un segment ou un gène ; il est toujours risqué de les étendre aux génomes entiers qui ont pu subir des recombinaisons et être des assemblages de segments ayant des phylogénies différentes. Ceci explique la difficulté, ou l'impossibilité, de décrire l'évolution des virus sous la forme d'un seul arbre phylogénétique (ou un petit nombre d'arbres). Par contre, l'estimation de la variation génétique dans une population virale, établie pour un gène ou un segment du

Tableau 2: Comparaison entre les méthodes utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires

Méthodes	Séquences	Avantages	Inconvénients	Programme	Remarques
Distances (<i>UPGMA</i> et <i>NJ</i>)	Très proches	Rapides ; Faciles à mettre en oeuvre	Tous les sites sont traités de manière équivalente d'où une perte d'informations ; Non applicables à des séquences éloignées	DNADIST PROTdist FITCH KITSCH	Il vaut mieux utiliser le Neighbor-joining plutôt qu'UPGMA car Nj autorise des taux de mutations différents le long des branches Possibilité d'introduire des corrections
Parcimonie	Relativement éloignées	Évaluation de différents arbres ; Informations sur les séquences ancestrales	Lente à l'exécution ; Inutilisable lorsque l'on a un grand nombre de séquences	DNAPars PROTpars	Obtention de plusieurs arbres équivalents et dans ce cas le choix de l'un par rapport aux autres peut être difficile à justifier
Maximum de Vraisemblance	Très éloignées	Robuste ; Taux de transitions/transversions différents ; Estimation de la longueur des branches de l'arbre final	Lente à l'exécution ; Inutilisable lorsqu'on a un grand nombre de séquences	DNAML Modeltest	

génomique, est très utile pour la caractériser et la comparer à d'autres populations différentes par l'hôte, la localisation, les propriétés biologiques, etc. Les arbres phylogénétiques sélectionnés comme les plus probables par des méthodes statistiques (ex : le bootstrapping) restent des constructions théoriques extrêmement utiles comme outils de travail (Anonyme, 2001 ; Leigh-Brown, 1994).

La reconstruction d'arbres phylogénétiques est utilisée par les programmes d'alignements multiples de séquences. Elle est basée sur différentes méthodes (Tableau 2) décrites ci-après.

2.1. Méthodes fondées sur les distances

Ces méthodes sont basées sur la recherche d'OTU « operational taxonomic units » (le plus souvent équivalent à une séquence nucléotidique ou protéique) les plus proches et ceci à chaque étape de regroupement. Ces méthodes sont rapides et donnent de bons résultats pour des séquences ayant une forte similarité. Dans ces méthodes, l'arbre sélectionné est celui présentant la somme des carrés des écarts entre les distances observées et les distances calculées la plus faible. Cela signifie que les branches de l'arbre ne peuvent pas avoir une longueur arbitraire mais sont proportionnelles au temps écoulé. Les arbres générés par cette méthode ne présentent pas de racine.

2.1.1. UPGMA "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean"

Cette méthode est utilisée pour reconstruire des arbres phylogénétiques si les séquences ne sont pas trop divergentes. UPGMA utilise un algorithme de clusterisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité, et la reconstruction de l'arbre se fait pas à pas grâce à cet ordre. Il y a d'abord l'identification des deux séquences les plus proches et ce groupe est ensuite traité comme un tout, puis on recherche la séquence la plus proche et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes. Cette méthode conduit essentiellement à un arbre non enraciné. L'inconvénient majeur de l'UPGMA est la sensibilité de la méthode à des taux de mutations différents sur les différentes branches (Anonyme, 2001).

2.1.2. *NJ "Neighbor-Joining"*

Cette méthode développée par Saitou & Nei (1987) tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches. Les données initiales permettent de construire une matrice qui donne un arbre en étoile. Cette matrice de distances est ensuite corrigée afin de prendre en compte la divergence moyenne de chacune des séquences avec les autres. L'arbre est alors reconstruit en reliant les séquences les plus proches dans cette nouvelle matrice. Lorsque deux séquences sont liées, le nœud représentant leur ancêtre commun est ajouté à l'arbre tandis que les deux feuilles sont enlevées. Ce processus convertit l'ancêtre commun en un nœud terminal dans un arbre de taille réduite (Anonyme, 2001, Harisson & Langdale, 2006).

2.2. Méthodes fondées sur les caractères

Ces méthodes sont très lentes à l'exécution par rapport aux méthodes basées sur les distances, mais elles sont précises.

2.2.1 *Méthode de Parcimonie*

Cette méthode consiste à minimiser le nombre d'évènements "pas" (mutations/substitutions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre dans une topologie de l'arbre. Pour cela, cette méthode s'appuie sur les hypothèses suivantes : 1/ les sites évoluent indépendamment les uns des autres (la séquence peut être considérée comme une suite de caractères non ordonnés), 2/ la vitesse d'évolution est lente et constante au cours du temps. Cette méthode, quand elle est appliquée à des séquences protéiques, utilise le code génétique pour comptabiliser le nombre de substitutions nécessaires (changements de bases) pour passer d'un site à l'autre, d'une séquence à l'autre. La méthode du maximum de parcimonie recherche toutes les topologies possibles afin de trouver l'arbre optimal (minimum), mais cela devient impossible lorsqu'on a plus de 15 séquences (Posada & Cradall, 1998 ; Anonyme, 2001 ; Harisson & Langdale, 2006).

2.2.2 Méthode du Maximum de vraisemblance

Cette méthode de reconstruction phylogénétique évalue, en termes de probabilités, l'ordre des branchements et la longueur des branches d'un arbre sous un modèle évolutif donné. La vraisemblance pour un site j est la somme des probabilités de toutes les possibilités de reconstruction de l'état ancestral sous le modèle choisi. L'arbre du maximum de vraisemblance est celui avec la vraisemblance la plus élevée.

Il faut savoir que plus on introduit de paramètres, plus le calcul sera long et plus il y aura une accumulation de petites erreurs : il vaut mieux utiliser un modèle simple. Le maximum de vraisemblance est une bonne méthode de reconstruction phylogénétique. Pour estimer les paramètres, on peut utiliser une méthode plus rapide et utiliser l'arbre obtenu pour fixer les paramètres de départ. Cette méthode n'est utilisable que si on a entre 10 et 20 séquences (Caraux *et al.*, 1995; Harisson & Langdale, 2006).

2.3. Fiabilité des arbres phylogénétiques

Après l'obtention d'un arbre, il faut ensuite évaluer la confiance que l'on peut avoir dans cet arbre. Pour cela plusieurs méthodes sont disponibles (Anonyme, 2001).

2.3.1. Le bootstrapping

Cette méthode, partant du postulat que les caractères évoluent de manière indépendante, est sans doute la plus utilisée en phylogénie. Elle a été inventée par Bradley Efron en 1979 et introduite en phylogénie dans le package Phylip par Felsenstein (1981).

Cette méthode génère un échantillonnage aléatoire (programme Seqboot du package Phylip) en prenant arbitrairement n colonnes (avec remplacements) de l'alignement d'origine (100 échantillons minimum). Elle procède ensuite, sur chacun des échantillons, à la recherche du ou des meilleurs arbres (avec une des méthodes phylogénétiques, option bootstrap). Elle recense alors les groupements les plus fréquemment rencontrés sur l'ensemble des arbres (issus de chaque échantillon) et restitue l'arbre consensus intégrant les groupements les plus fréquents, compatibles entre eux. Cette fréquence avec laquelle on retrouve un sous-arbre est la valeur de bootstrap (plus elle est élevée, plus la fiabilité de la branche est importante).

2.3.2. *Permutation*

Cette méthode introduite par Archie (1989), Faith, (1990) et Faith & Cranston (1991) est basée sur la permutation des colonnes de la matrice. Cela produit des matrices ayant le même nombre de colonnes et les mêmes caractères, mais qui n'ont plus de structure taxonomique. Cette méthode est utilisée dans un but différent par rapport au bootstrap : elle teste l'hypothèse qu'il y a bien une taxonomie dans les données actuelles (Legendre, 2000).

2.4 *Enraciner un arbre*

Le plus souvent, les méthodes de reconstruction phylogénétiques aboutissent à des arbres non enracinés. Pour enraciner un arbre, on peut ajouter une séquence « outgroup » dont on sait qu'elle est beaucoup plus ancienne que toutes les autres séquences (Mathews & Donoghue, 1999 ; Simmons *et al.*, 2000). Cependant, il ne faut pas que la séquence choisie pour enraciner l'arbre soit 1/ trop éloignée des autres données (en effet, cela peut conduire à des erreurs dans la topologie de l'arbre), 2/ trop proche des séquences car dans ce cas, cela n'est peut-être pas un vrai "outgroup". L'utilisation de plus d'un "outgroup" améliore en général l'évaluation de l'arbre. Par ailleurs, en l'absence d'un bon "outgroup", la racine peut être positionnée approximativement à égale distance de toutes les séquences : on parle alors de "mid-point rooting".

2.5. *Variation de phylogénie*

La topologie des arbres est soumise à de nombreuses variations et dépendent 1/ de la nature des séquences utilisées (acides nucléiques ou protéines), 2/ de la méthode utilisée (méthodes de distances ou parcimonie), 3/ de la qualité de l'alignement, 4/ du nombre de séquences incluses dans l'alignement, 5/ de l'ordre des séquences dans l'alignement et du choix de la racine. Pour construire des arbres phylogénétiques représentatifs de la réalité, il faut donc : 1/ avoir le plus grand nombre de gènes homologues possibles, 2/ aligner les séquences très soigneusement, 3/ éliminer les régions ambiguës, les régions hypervariables et les "gaps" d'alignements, 4/ utiliser si possible plusieurs méthodes de reconstruction, et 5/ évaluer la fiabilité de l'arbre ("bootstrapping"). Par ailleurs, lorsque plusieurs gènes sont considérés, les arbres obtenus sont souvent différents pour différentes causes : 1/ tous les gènes n'ont pas la même vitesse d'évolution, 2/ l'évolution est convergente, 3/ des phénomènes de

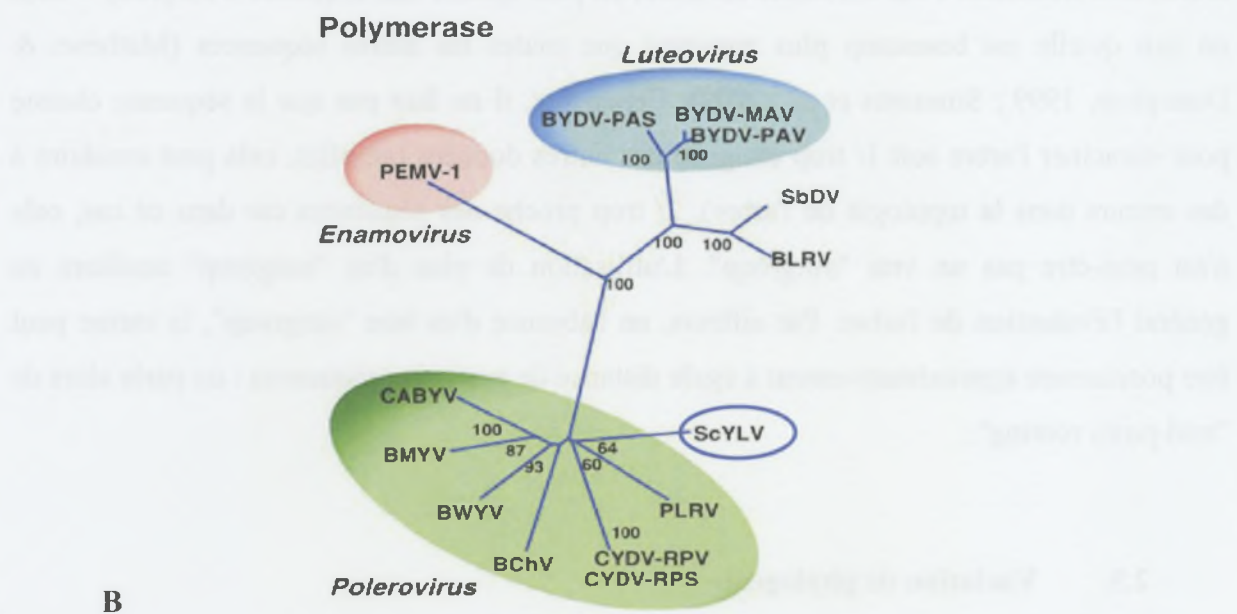
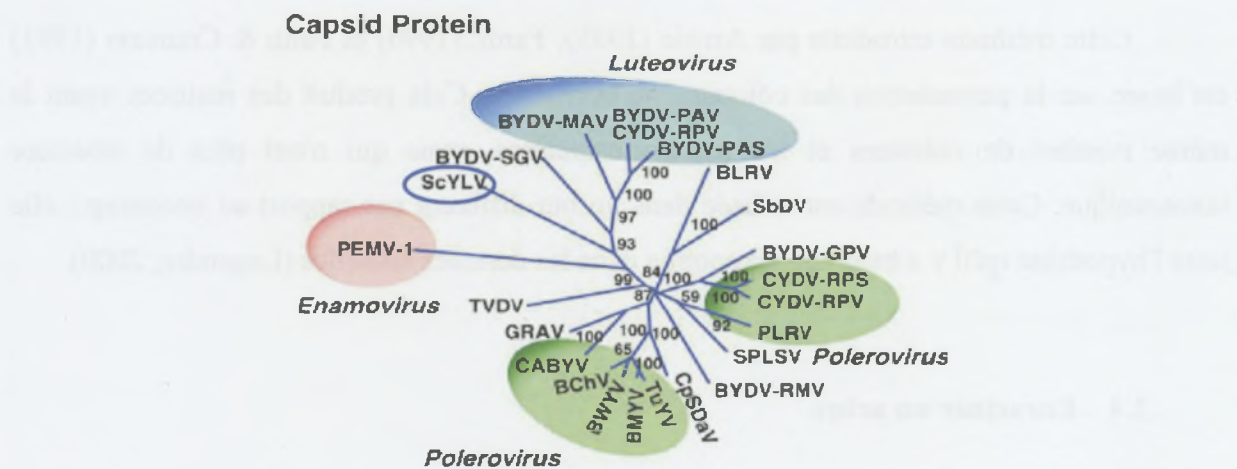


Figure 17 : Arbres phylogénétiques obtenus par l'analyse des séquences protéiques des espèces représentatives de la famille des *Luteoviridae* y compris le SCYLV (A) à partir de l'alignement des séquences de la protéine de capside, (B) à partir de l'alignement des séquences de la polymérase. Alignements obtenus avec CLUSTALX et arbres construits avec PAUP. Les valeurs de bootstrap au-dessus de 50% sont indiquées (reproduit de D'Arcy et Domier, 2005).

recombinaison et de transfert de gènes ont lieu, et 4/ une confusion entre gènes paralogues (duplication au sein d'une espèce) et gènes orthologues (même gène dans des espèces différentes) est possible (Caraux *et al.*, 1995).

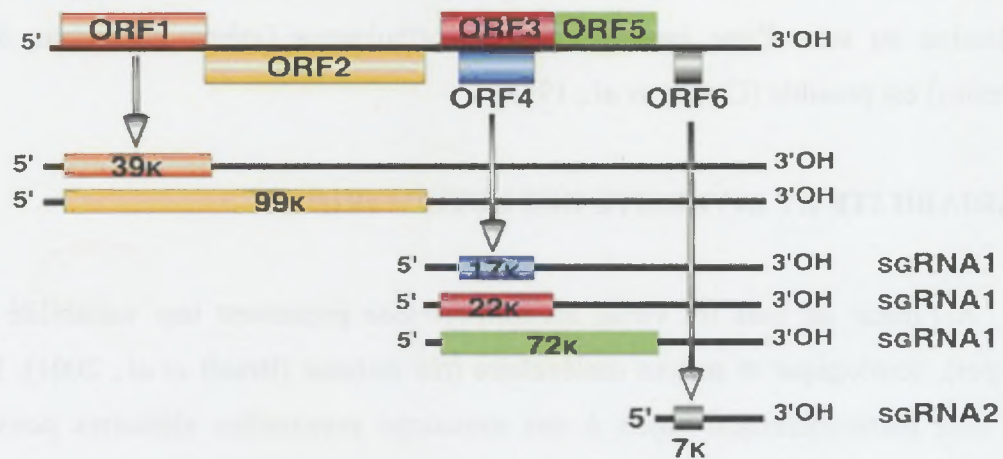
3. VARIABILITE ET DIVERSITE DES LUTEOVIRIDAE

A l'instar de tous les virus, les *Luteoviridae* présentent une variabilité biologique (biotypes), sérologique et surtout moléculaire très étendue (Brault *et al.*, 2001). Les virus à ARN sont particulièrement sujets à des mutations ponctuelles aléatoires pouvant être à l'origine de leur variabilité et de leur adaptabilité (Drake, 1993 ; Drake & Holland, 1999). Il est important de noter que la fréquence de mutation semble corrélée à l'étendue de la gamme d'hôte. Ainsi certaines espèces de cette famille ont une gamme d'hôte relativement étroite et une très faible fréquence de mutation (cas du *Potato leafroll virus* PLRV), tandis que le *Beet western yellow virus* (BWYV) qui infecte un nombre plus large d'hôtes montre de plus grandes variations de séquence (de Miranda *et al.*, 1995)

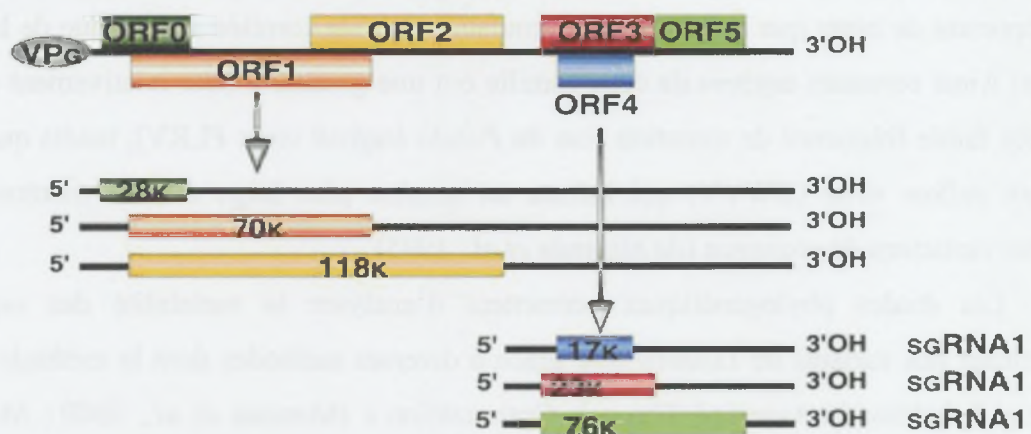
Les études phylogénétiques permettent d'analyser la variabilité des espèces et d'identifier des variants de *Luteoviridae* grâce à diverses méthodes dont la méthode PLATO « Partial Likelihoods Assessed Through Optimization » (Moonan *et al.*, 2000 ; Moonan & Mirkov 2002). Cette méthode permet d'évaluer la parenté phylogénétique des *Luteoviridae*, de déterminer les sites potentiels de recombinaison et également de formuler des hypothèses sur l'évolution de ces virus. L'existence de sites où ont pu se produire des recombinaisons dans le génome des *Luteoviridae* a conduit à l'identification des ancêtres viraux ayant pu donner naissance à cette famille de virus (Moonan *et al.*, 2000).

La structure des séquences codant pour la polymérase RdRp des *Luteoviridae* a initialement servi de support pour le classement au sein de cette famille (D'Arcy *et al.*, 2005 ; Koonin & Dolja, 1993) (Figure 17B). La comparaison des séquences des gènes a montré que la séquence de la protéine de capsid (CP) n'était pas suffisante pour permettre la classification des virus au sein d'un des trois genres constituant la famille des *Luteoviridae* (Figure 17 et 18). Les virus de cette famille ne possèdent pas de queue poly-adénosine (poly-A) à l'extrémité 3' de leur génome (Mayo & Miller, 1999) et la séquence complète du génome et l'analyse phylogénétique des séquences des acides aminés de la polymérase ont conduit à la mise en place d'une nouvelle classification séparant cette famille en trois genres : *Luteovirus*, *Polerovirus* et *Enamovirus* (Mayo & Miller, 1999). Ces trois genres actuels proviennent probablement d'un ancêtre commun, qui a ensuite divergé en deux genres distincts, suite à des

Luteovirus BYDV-PAV Genomic RNA 5,677 nts



Polerovirus PLRV Genomic RNA 5,882 nts



Enamovirus PEMV-1 Genomic RNA 5,705 nts

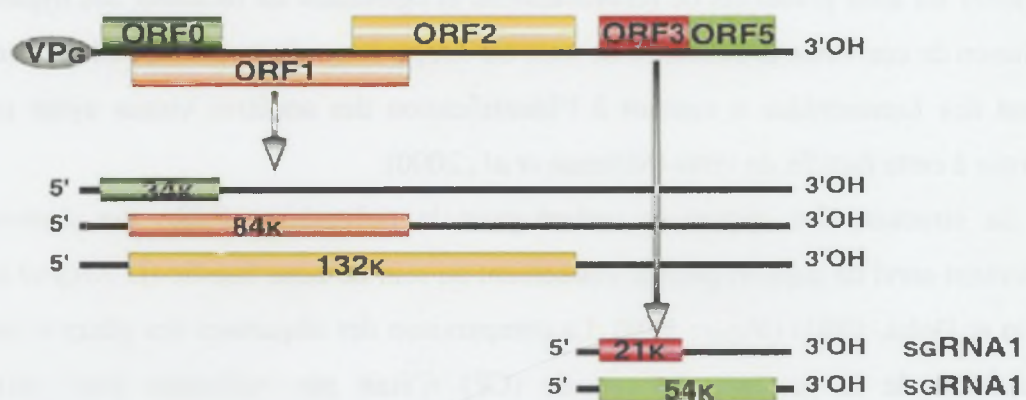


Figure 18 : Organisation du génome des trois genres de virus composant la famille des *Luteoviridae*. Les ORFs traduits à partir de l'ARN génomique (ARNg) ou de l'ARN sub-génomique (ARNsg) et les protéines codées par ces ORFs sont indiqués sous forme de boîtes de la même couleur (D'après Van Regenmortel *et al.*, 2000).

NB : Cette figure ne tient pas en compte des ORFs 6 et 7 que l'on ne retrouve pas chez tous les virus du genre *Polerovirus* (Mayo *et al.*, 1989 ; Ashoub *et al.*, 1998).

recombinaisons avec des virus actuellement représentés par les *Sobemovirus* et les *Tombusviridae* (Gibbs *et al.*, 1995).

L'information génétique est particulièrement condensée chez les virus de la famille *Luteoviridae* et notamment chez le genre *Polerovirus* puisque plus de 25% du génome consiste en des chevauchements de cadres ouverts de lecture (ORFs), c'est-à-dire en des régions supportant une double information génétique, grâce à des décalages entre cadres de lecture. Les génomes des *Luteoviridae* contiennent généralement 5 ou 6 ORFs (Figure 18 et tableau 1) ou 8 ORFs comme c'est le cas du *Potato leafroll virus* PLRV (*Polerovirus*) (Ashoub *et al.*, 1998; Taliansky *et al.*, 2003), et les genres peuvent être distingués sur la base des arrangements et des tailles des ORFs (Mayo *et al.*, 1989 ; Ashoub *et al.*, 1998).

Les ORFs codant les protéines liées à la réplication (ORFs 1 et 2) des lutéovirus ne sont pas homologues à ceux des polérovirus. Les produits des ORFs 1 et 2 des lutéovirus sont plus semblables à ceux des virus de la famille *Tombusviridae*, alors que les produits des ORFs 1 et 2 des polérovirus et des enamovirus sont liés à ceux des sobémovirus. Cela suggère qu'un ancêtre de la famille *Luteoviridae* a acquis une nouvelle polymérase par recombinaison, entraînant la divergence entre les genres *Polerovirus* et *Luteovirus* (Gibbs, 1995, Chalhoub & Lapierre, 1995).

Par ailleurs, l'ORF 0 et l'ORF 4 sont absents dans les génomes des lutéovirus et des enamovirus respectivement, et l'ORF 6 n'est présent que dans certains génomes des lutéovirus et polérovirus (Figure 18 et 19). Chez les polérovirus et les enamovirus, les ORFs 0 et 1 se chevauchent partiellement, ainsi que les ORF 1 et 2. L'ORF 4 est contenu complètement dans l'ORF 3 chez les lutéovirus et les polérovirus. Les différences entre les lutéovirus, les polérovirus et les enamovirus se situent principalement dans l'extrémité 5' du génome (Figure 18). Les ORFs 0, 1 et 2 sont exprimés par traduction directe de l'ARN génomique (ARNg) et le signal de décalage de cadre de lecture entre les ORFs 1 et 2 est séparé du codon stop de l'ORF 1 par environ 400 nucléotides chez les polérovirus, alors qu'il est situé immédiatement en amont de celui-ci chez les lutéovirus. Les ORFs 3, 4 et 5 (chez les lutéovirus et les polérovirus) sont exprimés par la traduction d'un ARN sub-génomique (sgARN1) situé en 3' de l'ARNg. L'ORF 5 est traduit par une protéine de fusion (ORF 3 + ORF 5) appelée protéine de translecture (read-through protein) après la traduction de l'ORF 3. Les lutéovirus produisent un second ARN sub-génomique (sgARN2) qui régule la traduction de l'ARNg et sert de messenger à l'ORF 6 (Brault *et al.*, 2001; Moonan *et al.*, 2000). Aujourd'hui, les fonctions de

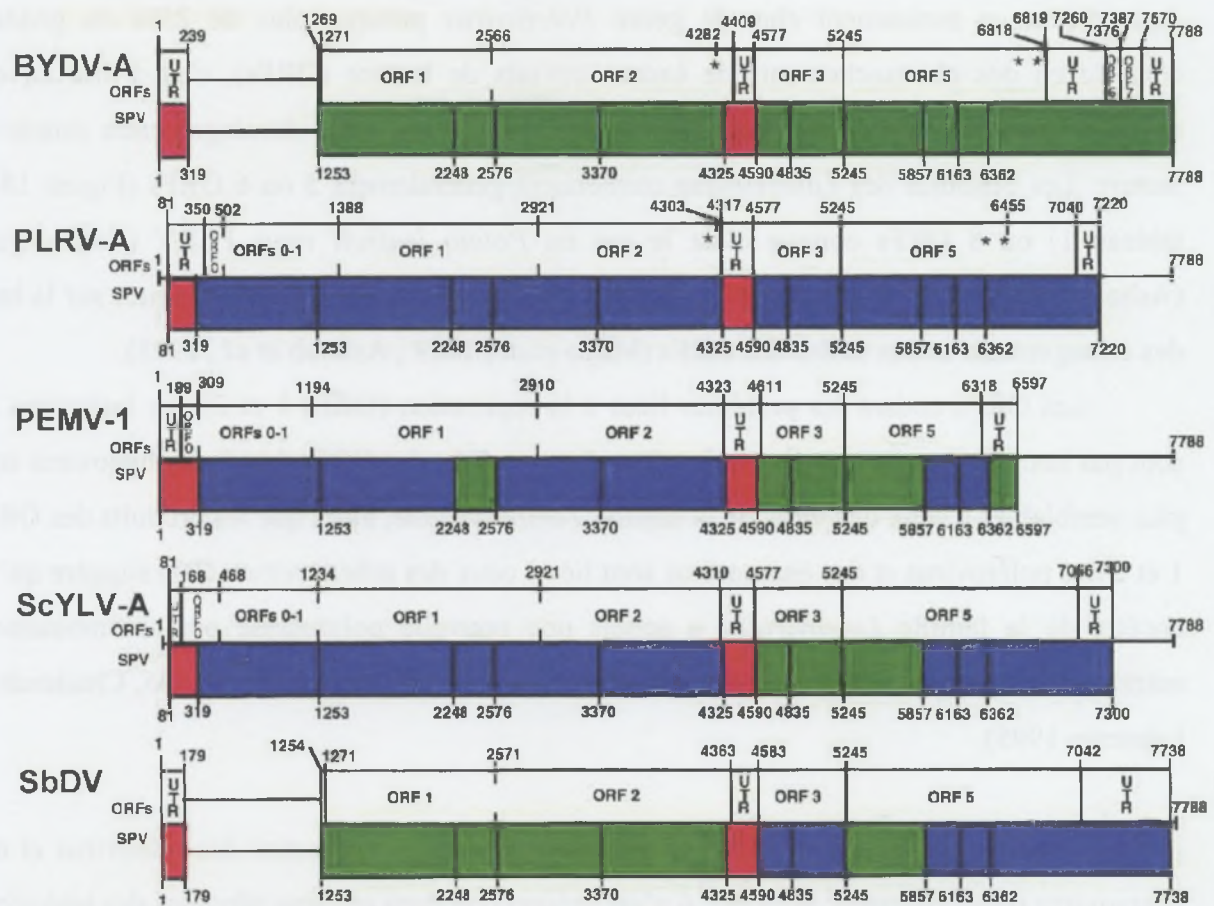


Figure 19 : Comparaison des profils de variation phylogénétique spatiale (SPV) entre cinq membres de la famille des *Luteoviridae* révélant la structure en mosaïque des génomes du PEMV-1, du SCYLV et du SbDV. Certaines régions seraient d'origine "*Polerovirus*" (en bleu) ou "*Luteovirus*" (en vert). Les astérisques simples et doubles correspondent respectivement aux sites d'initiation de la transcription des ARNs subgénomiques 1 et 2. Les régions non codantes sont représentées en rouge (d'après Moonan *et al.*, 2000).

certaines protéines codées par le génome de différents genres de *Luteoviridae* sont connues (Tableau 1). Enfin, la comparaison des séquences des régions non traduites (UTRs) a montré qu'il n'y avait pas de similarités discernables dans ces UTRs dans les deux extrémités 5' et 3' et n'importe quelle séquence dans les bases de données (Smith *et al.*, 2000).

La taille du génome au sein des *Luteoviridae* varie selon l'espèce : 5641 nucléotides pour le BWYV, 5882 nucléotides pour le PLRV et 5895-5898 nucléotides pour le SCYLV (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000).

4. DIVERSITE GENETIQUE DU SCYLV

Plusieurs isolats du SCYLV ont été caractérisés et entièrement séquencés : SCYLV-maia du Brésil (Maia *et al.*, 2000) , SCYLV-A de Floride (Moonan *et al.*, 2000) , SCYLV-F d'Australie (Smith *et al.*, 2000) et SCYLV-IND d'Inde (Gaur *et al.*, 2003). Les particules virales de ces isolats ont été décrites comme ayant des propriétés sérologiques légèrement différentes : les virions de l'isolat SCYLV-A réagissent fortement avec l'antisérum produit contre le *Polerovirus* CYDV-RPV (Scagliusi & Lockhart, 2000), tandis que l'isolat SCYLV-maia réagit surtout avec l'antisérum produit contre le lutéovirus BYDV-PAV (Vega *et al.*, 1997).

Les similarités de séquences nucléotidiques suggèrent qu'au moins deux recombinaisons indépendantes se sont produites pendant l'évolution du génome du SCYLV. Le SCYLV est donc considéré comme un virus émergeant qui a évolué par la recombinaison entre un ancêtre poléroviral et un ancêtre lutéoviral de la famille des *Luteoviridae* (Moonan *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2000).

Suite au développement de techniques de diagnostic sérologique et moléculaire (Schenck *et al.*, 1997 ; Comstock *et al.*, 1998), la présence du SCYLV a été mise en évidence dans la plupart des pays producteurs de canne à sucre (Lockhart & Cronjé, 2000). La distribution mondiale de SCYLV a conduit plusieurs groupes de recherche à étudier la diversité génétique de SCYLV. Deux groupes génétiques ont été identifiés dans une collection d'isolats collectés sur le continent américain (Moonan & Mirkov, 2002). Un groupe contenait seulement des isolats de Colombie (population-C) et un deuxième groupe (super-population) était formé par des isolats d'autres pays (Argentine, Brésil, Guatemala, USA/Floride-Louisiane-Texas). La variabilité du gène codant pour la polymérase était plus grande dans la "population-C" que dans la "super-population" et il a été formulé l'hypothèse que la super-population a dérivé de la population C. On note cependant que cette étude n'est pas

représentative de la diversité mondiale du virus étant donné l'origine des échantillons analysés, et cette hypothèse est remise en cause. Une autre étude de la diversité génétique a été menée en Australie par Borg *et al*, (2001). Des échantillons de neuf pays ont été inclus dans cette étude, mais la technique utilisée (fingerprinting) présente un intérêt limité pour des études de phylogénie.

Par ailleurs, des analyses de la séquence de fragments issus de chacun des six ORFs du génome du SCYLV, et de 72 isolats de ce virus originaires de 18 zones géographiques, a permis de confirmer la grande variabilité du SCYLV (Rassaby, 2001). Il s'est avéré que les gènes codant pour la protéine de capsid (ORF 3) et la protéine de mouvement (ORF 4) étaient très homogènes chez le SCYLV. En revanche, les gènes codant pour les ORFs 0, 1, 2 et 5 sont variables. Ces résultats suggèrent l'existence de plusieurs génotypes du SCYLV et les travaux entrepris au début de cette thèse avaient pour objectif de la confirmer en analysant la séquence entière de plusieurs isolats du SCYLV. Le génome de cinq isolats du SCYLV originaires du Brésil, de Chine, du Pérou et de La Réunion a été entièrement séquencé et le génome d'un isolat originaire de Cuba a été séquencé à 40%. Des analyses phylogénétiques ont permis de montrer qu'il existe plusieurs génotypes du SCYLV dont un génotype majoritaire à La Réunion. Un génotypage par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques a ensuite été réalisé pour étudier la distribution de ces génotypes dans 18 zones de production de canne à sucre.

Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme de deux articles : L'article 1 a été publié dans la revue *Archives of Virology* et l'Article 2 a été publié dans la revue *Plant Disease*.

4.1. La feuille jaune de la canne à sucre est causée par au moins trois génotypes différents de *Sugarcane yellow leaf virus*, dont un génotype prédominant à l'île de la Réunion.

Article 1

Abu Ahmad, Y., Rassaby, L., Royer, M., Borg, Z., Braithwaite, K. S., Mirkov, E., Irej, M. S., Perrier, X., Smith, G. R., and Rott, P. 2006a. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. Archives of Virology, 151:1355-1371.

**Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different
genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which
predominates on the Island of Réunion**

**Y. Abu Ahmad¹, L. Rassaby¹, M. Royer¹, Z. Borg², K. S. Braithwaite²,
T. E. Mirkov³, M. S. Ireby⁴, X. Perrier⁵, G. R. Smith², and P. Rott¹**

¹UMR 385 AGRO.M-CIRAD-INRA Biologie et Génétique des Interactions
Plante-Parasite, Centre de Coopération Internationale en Recherche
Agronomique pour le Développement, Montpellier, France

²David North Plant Research Centre, BSES Limited, Indooroopilly,
Queensland, Australia

³Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University System
Agricultural Experiment Station, Weslaco, Texas, U.S.A.

⁴US Sugar Corporation, Clewiston, Florida, U.S.A.

⁵UPR 75 Multiplication Végétative Centre de Coopération Internationale en Recherche
Agronomique pour le Développement, Montpellier, France

Received September 12, 2005; accepted December 14, 2005

Published online February 2, 2006 © Springer-Verlag 2006

Summary. The genetic diversity of sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) was analyzed with 43 virus isolates from Réunion Island and 17 isolates from world-wide locations. We attempted to amplify by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), clone, and sequence four different fragments covering 72% of the genome of these virus isolates. The number of amplified isolates and useful sequence information varied according to each fragment, whereas an amplicon was obtained with diagnostic primers for 59 out of 60 isolates (98%). Phylogenetic analyses of the sequences determined here and additional sequences of 11 other SCYLV isolates available from GenBank showed that SCYLV isolates were distributed in different phylogenetic groups or belonged to single genotypes. The majority of isolates from Réunion Island were grouped in phylogenetic clusters that did not contain any isolates from other origins. The complete six ORFs (5612 bp) of five SCYLV isolates (two from Réunion Island, one from Brazil, one from China, and one from Peru) were amplified, cloned, and sequenced. The existence of at least three distinct genotypes of SCYLV was shown by phylogenetic analysis of the sequences of these isolates and additional published sequences of three SCYLV isolates (GenBank accessions). The biological significance of these

genotypes and of the origin of the distinct lineage of SCYLV in Réunion Island remains to be determined.

Introduction

Yellow leaf of sugarcane, previously called yellow leaf syndrome (YLS), is caused by sugarcane yellow leaf virus (SCYLV; family *Luteoviridae*) [13, 15, 25]. The disease was first reported in Hawaii and in Brazil in the late 1980s and early 1990s [22, 28], and the pathogen was subsequently found to be widespread in most sugarcane-producing countries [12]. The most prominent symptom of the disease is a yellowing of the midrib on the abaxial surface of the leaf, which may extend into the lamina, although this symptom may be related to other biotic or abiotic factors [12]. SCYLV can cause important yield losses in cultivars susceptible to yellow leaf, even if infected plants do not exhibit overt disease symptoms [10, 20, 28]. The virus is transmitted by the aphids *Melanaphis sacchari* and *Rhopalosiphum maidis* [21].

The complete genome of SCYLV has been sequenced and characterized [15, 25]. It is monopartite and consists of a positive-sense single stranded RNA of 5,895–5,898 nucleotides (Fig. 1). The viral genome encodes at least six open reading frames (ORFs 0–5) and shows a genome organisation typical of poleroviruses. Nucleotide sequence similarities suggest that at least two independent recombinations have occurred during evolution of the SCYLV genome. SCYLV is therefore considered to be an emerging virus that has evolved by recombination between ancestors of the three genera (*Luteovirus*, *Polerovirus*, and *Enamovirus*) forming the family *Luteoviridae* [15, 25]. Although SCYLV shares genomic properties with members of the genera *Polerovirus* and *Luteovirus* [2], it has recently been assigned to the genus *Polerovirus* of the family *Luteoviridae* by the International Committee on Taxonomy of Viruses on the basis of its striking similarities to the 5' half of the polerovirus genome [8, 26].

The function of the peptide encoded by ORF0 may be linked to expression of symptoms [27], and more recently has been shown to be a suppressor of RNA

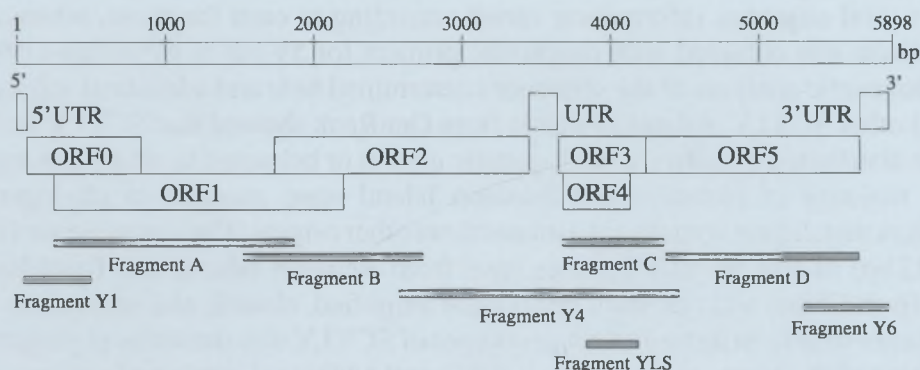


Fig. 1. Genome organisation of SCYLV and location of the fragments amplified by RT-PCR.
UTR: untranslated region, ORF: open reading frame

silencing (Mirkov, unpublished results). ORFs 1 and 2 are translated together and code for a multifunctional peptide and an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), respectively. The peptide sequence encoded by ORF1 includes sequence motifs of both a serine proteinase and a putative genome-linked viral protein (VPg). ORF3 codes for the coat protein and ORF4 for a movement protein, whereas the peptide encoded by ORF5 is a read-through protein. This latter protein is produced via a translational read-through of the peptide encoded by ORF3 and might be linked to virus transmission by aphids [29].

Following the development of reliable serological and molecular diagnostic techniques [7, 24], SCYLV was found to be widespread in most sugarcane-producing countries [12]. The world-wide distribution of SCYLV led several research groups to study the genetic diversity of SCYLV. Moonan and Mirkov [16] identified two groups of the pathogen among virus isolates collected from North, South, and Central America. One group contained only isolates from Colombia (C-population) and the second group (superpopulation) was formed by the isolates from the other countries (Argentina, Brazil, Guatemala, USA/Florida-Louisiana-Texas). Borg et al. [3] showed that fingerprinting the viral sequence from various SCYLV-positive cultivars reveals diversity in SCYLV sequences both between and within different geographic locations in the world.

SCYLV was first detected in Réunion Island in 1996, but unusual leaf yellowing symptoms had been observed for several years earlier. A survey conducted at different locations from 1998 to 2001 indicated that SCYLV was widespread throughout Réunion Island in three major commercial cultivars, and infection rates varied between 10% and 100% according to the cultivar and location [18, 19]. The objective of our study was to evaluate the genetic diversity of SCYLV in Réunion Island in comparison with other locations. We report in this paper the existence of at least three genotypes of SCYLV, and that one of these genotypes was only found in Réunion Island.

Material and methods

Leaf samples and RNA extraction

Thirty-nine sugarcane leaf samples infected by SCYLV (REU1-REU48) were collected from 15 cultivars and 5 locations in Réunion Island (Table 1). Four additional samples originating from Réunion Island (isolates REU0, REU-YL1, REU-YL2 and REU-YL3) were obtained from the sugarcane quarantine of CIRAD in Montpellier, France [6]. Leaf samples from 17 cultivars infected by SCYLV that originated from 13 other locations in the world also were collected from the quarantine facility. Leaves were stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted and purified from sugarcane leaves (100 mg of lamina and midrib) with the RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total RNA was eluted in a final volume of 40 μl of diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water and stored at -20°C .

Detection of SCYLV in leaf samples

Tissue blot immunoassay (TBIA) and RT-PCR were used to identify the presence of SCYLV in the leaf samples. TBIA was performed as described by Schenck et al. [24], except that

Table 1. Characteristics of the isolates of sugarcane yellow leaf virus used in this study

Isolate*	Geographic origin	Sugarcane host cultivar	GenBank accession number
<i>B1</i>	<i>Brazil (Sao-Paulo)</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>AF369925</i>
BRA1	Brazil	SP83-5073	AJ606086, AJ582772, AJ582790
BRA2	Brazil	RB83-5054	AJ621180, AJ582779, AM072623
BRA-YL1	Brazil	SP71-6163	AM072750
<i>C1</i>	<i>Colombia (Cali)</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>AF369927</i>
<i>C4</i>	<i>Colombia (Cali)</i>	<i>CC84-75</i>	<i>AF369929</i>
CHN-YL1	China	CGT63-167	AM072751
COL4	Colombia	SP71-6163	AJ582778, AJ582789, AM072624
CUB-YL1	Cuba	C132-81	AM083988
<i>G2</i>	<i>Guatemala (Santa-Lucia)</i>	<i>CP92-1654</i>	<i>AF369924</i>
<i>L1</i>	<i>Louisiana (Baton Rouge)</i>	<i>LHo83-153</i>	<i>AF369923</i>
LKA1	Sri-Lanka	SLC9225	AM072625
<i>maia</i>	<i>Brazil (Sao-Paulo)</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>AF141385</i>
MTQ1	Martinique	FR91485	AM072626
MUS1	Mauritius	M99/48	AJ606085, AJ582764
MYS1	Malaysia	TC4	AJ606084, AJ582766
<i>N6</i>	<i>Argentina (Santa-Rosa)</i>	<i>Q136</i>	<i>AF369926</i>
PER1	Peru	H32-8560	AJ621179, AJ582767, AM072627
PER-YL1a	Peru	H50-7209	AM072752
PER-YL1b	Peru	H50-7209	AM072753
PHL1	Philippines	VMC76-16	AJ582761, AM072628
REU0	Réunion Island	R83-1592	AM072629
REU1	Réunion Island (Le Gol)	R570	AJ621163
REU2	Réunion Island (Le Gol)	R577	AJ621166, AJ582785
REU3	Réunion Island (Le Gol)	R577	AJ606090, AJ582773, AJ582786
REU4	Réunion Island (Le Gol)	R570	AJ621176, AJ582776
REU5	Réunion Island (Vue-Belle)	M1371/79	AJ582763
REU7	Réunion Island (Vue-Belle)	CP70-1133	AJ621161
REU9	Réunion Island (Vue-Belle)	R575	AJ606092
REU11	Réunion Island (Vue-Belle)	R573	AJ621164
REU12	Réunion Island (Vue-Belle)	R569	AJ606087, AJ582765, AJ582791
REU13	Réunion Island (Vue-Belle)	M1371/79	AJ606088, AJ582769, AJ582783
REU15	Réunion Island (St-Benoît)	R579	AJ621165, AM072633
REU17	Réunion Island (St-Benoît)	R576	AJ606089
REU18	Réunion Island (St-Benoît)	R575	AM072634
REU19	Réunion Island (St-Benoît)	R576	AM072635
REU20	Réunion Island (St-Benoît)	R579	AJ621167, AM072636
REU21	Réunion Island (Savanna)	R579	AM072637
REU22	Réunion Island (St-Benoît)	R570	AJ621168, AM072638
REU24	Réunion Island (St-Benoît)	R575	AJ582759, AM072639
REU25	Réunion Island (Savanna)	R570	AJ582760
REU26	Réunion Island (Savanna)	R575	AJ621169, AM072640
REU28	Réunion Island (La Mare)	R490	AM072641
REU29	Réunion Island (La Mare)	R81-0834	AJ621160, AJ582771, AM072642

(continued)

Distinct SCYLV genotype on Réunion Island

Table 1 (continued)

Isolate*	Geographic origin	Sugarcane host cultivar	GenBank accession number
REU30	Réunion Island (Savanna)	R575	AJ621170, AM072643
REU31	Réunion Island (La Mare)	AY7	AJ621171, AJ582781, AJ582788, AM072644
REU32	Réunion Island (La Mare)	R579	AJ606091
REU33	Réunion Island (La Mare)	R490	AJ621172, AM072645
REU34	Réunion Island (La Mare)	R570	AJ621173, AM072646
REU35	Réunion Island (Vue-Belle)	R577	AJ582787, AM072647
REU37	Réunion Island (La Mare)	R81-0834	AJ582775, AM072648
REU38	Réunion Island (La Mare)	R575	AJ621174, AM072649
REU39	Réunion Island (La Mare)	AY7	AJ621175, AM072650
REU40	Réunion Island (La Mare)	SP71-6163	AJ621177, AJ582782, AJ582784, AM072651
REU41	Réunion Island (La Mare)	R490	AM072652
REU42	Réunion Island (La Mare)	SP71-6163	AJ621159, AJ582762, AJ582792, AM072653
REU43	Réunion Island (La Mare)	R575	AM072654
REU45	Réunion Island (La Mare)	R579	AJ582774, AM085305
REU46	Réunion Island (La Mare)	S17	AM072655
REU47	Réunion Island (La Mare)	R570	AJ621178
REU48	Réunion Island (La Mare)	S17	AM072656
REU-YL1a	Réunion Island (La Mare)	R570	AM072754
REU-YL1b	Réunion Island (La Mare)	R570	AM072755
REU-YL2	Réunion Island (La Mare)	R490	AM072756
REU-YL3	Réunion Island (La Mare)	SP71-6163	AM085306, AM085307
SCYLV-A	<i>Texas</i>	<i>CP65-357</i>	<i>AF157029</i>
SCYLV-F	<i>Florida</i>	<i>CP65-357</i>	<i>AJ249447</i>
SCYLV-IND	<i>India</i>	—	<i>AY236971</i>
SEN1	Senegal	NA63-90	AJ582768
<i>Taiw1</i>	<i>Taiwan</i>	<i>ROC11</i>	<i>AJ491144, AJ491127</i>
TWN1	Taiwan	ROC6	AM072630
USA1	Florida	TCP87-3388	AM072631
USA2	Florida	CP85-1491	AJ621162, AJ582780, AM072632

*Isolates in italics were not amplified and sequenced in this study, and data are from GenBank

nitrocellulose membranes and Fast Blue BB salt (Sigma®) were used. TBIA membranes were analyzed with a stereomicroscope ($\times 100$) to determine positive reactions. RT-PCR with primers YLS111 and YLS462 (Table 2) was performed according to Comstock et al. [7]. The amplified fragment from the coat protein has an expected size of 351 bp (fragment YLS, Fig. 1).

Production of amplicons by RT-PCR

Attempts to amplify four fragments of the SCYLV genome from the 60 virus isolates were done using the Titan One Tube RT-PCR System kit (Roche) and primer pairs located in the different ORFs of the genome (Table 2 and Fig. 1). It should be noted that the Titan system uses a

Table 2. Location of amplified fragments in the sugarcane yellow leaf virus genome and characteristics of the primers used for RT-PCR

Amplified fragment and position in the genome (Fig. 1)	Name of primers	Genome position	5'-3' sequence	Source
A (partial ORFs 0 and 1)	ORF1 START	242-265	ATGGCCCCAACACTCCCGTTTACA	Borg Z et al., unpublished
	160R.640R	1862-1843	GAATCAACTGCGAGACGATG	Borg Z et al., unpublished
B (partial ORF2)	oFM323	1518-1534	CAGACATTGCTGATTAC	Moonan and Mirkov [16]
	oFM359	2729-2711	GCTCTCCACAAAGCTATCT	Moonan and Mirkov [16]
C (partial ORFs 3 and 4)	oFM336	3667-3685	GCTCACGAAGGAATGTCAG	Moonan and Mirkov, unpublished
	oFM361	4352-4334	TGTTTTTCACGATGTGGTTC	Moonan and Mirkov [16]
D (partial ORF5)	104R.613R	4367-4386	ATATCTAGATGTGGGTCCGC	Borg Z et al., unpublished
	3'PRIME2	5666-5647	GGAGGAGGAAGATTTCCGGTG	Borg Z et al., unpublished
Y1 (partial 5'UTR, ORFs 0 and 1)	ORF0 FOR	36-52	TGGACCAAGCCTCTGAC	This study
	ORF0 REV	503-486	CCAGCATACTGGAGTAGC	This study
Y4 (ORFs 3 and 4, partial ORFs 2 and 5)	B FOR	2563-2582	GGATTGTGCGATCCGATTCCG	This study
	B REV	4442-4423	CAGTTGCTCAATGCTCCACG	This study
Y6 (3'UTR and partial ORF5)	Y6F-PER*	5293-5312	CTAACGCTTCGCGCGCAGCC	This study
	ORF5 FOR	5294-5313	CTAACGCTTCACGTTCCAGCC	This study
	ORF5 REV	5880-5861	GCAGTGCCTCCCTGTATTCC	This study
YLS (partial ORFs 3 and 4)	YLS111	3827-3846	TCTCACTTTCACGGTTGACG	Irey M, unpublished
	YLS462	4178-4157	GTCTCCATTCCCTTTGTACAGC	Irey M, unpublished

*Primer specifically used for amplification of fragment Y6 of isolate PER-YL1

Distinct SCYLV genotype on Réunion Island

mixture of proofreading polymerases. The same RNA template was used for all PCR reactions. The 25 μ l RT-PCR reaction mix consisted of 0.5 or 1 μ l eluted RNA, 5 μ l RT-PCR buffer (5 \times), 1.25 μ l DTT solution (100 mM), 0.25 μ l RNase inhibitor (40 U μ l⁻¹), 0.5 μ l dNTP mix (10 mM), 0.5 μ l Titan enzyme mix, 0.05 μ l (primers ORF1START/160R.640R and primers 104R.613R/3'PRIME2) or 0.1 μ l (primers oFM323/oFM359 and primers oFM336/oFM361) of each primer (100 μ M), and DEPC water to final volume. The RT-PCR program for amplification of fragment A with primers ORF1START/160R.640R was 54 °C for 60 min, 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 15 sec, 61 °C for 2 min, and 68 °C for 2 min with a final 68 °C extension for 10 min. The RT-PCR program for amplification of fragment B with primers oFM323/oFM359 was 50 °C for 60 min, 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 15 sec, 52 °C for 2 min, and 68 °C for 2 min with a final 68 °C extension for 10 min. The RT-PCR program for amplification of fragment C with primers oFM336/oFM361 was 53 °C for 60 min, 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 15 sec, 59 °C for 2 min, and 68 °C for 2 min with a final 68 °C extension for 10 min. The RT-PCR program for amplification of fragment D with primers 104R.613R/3'PRIME2 was 50 °C for 60 min, 94 °C for 2 min, 40 cycles at 94 °C for 30 sec, 59 °C for 30 sec, and 68 °C for 45 sec with a final 68 °C extension for 10 min.

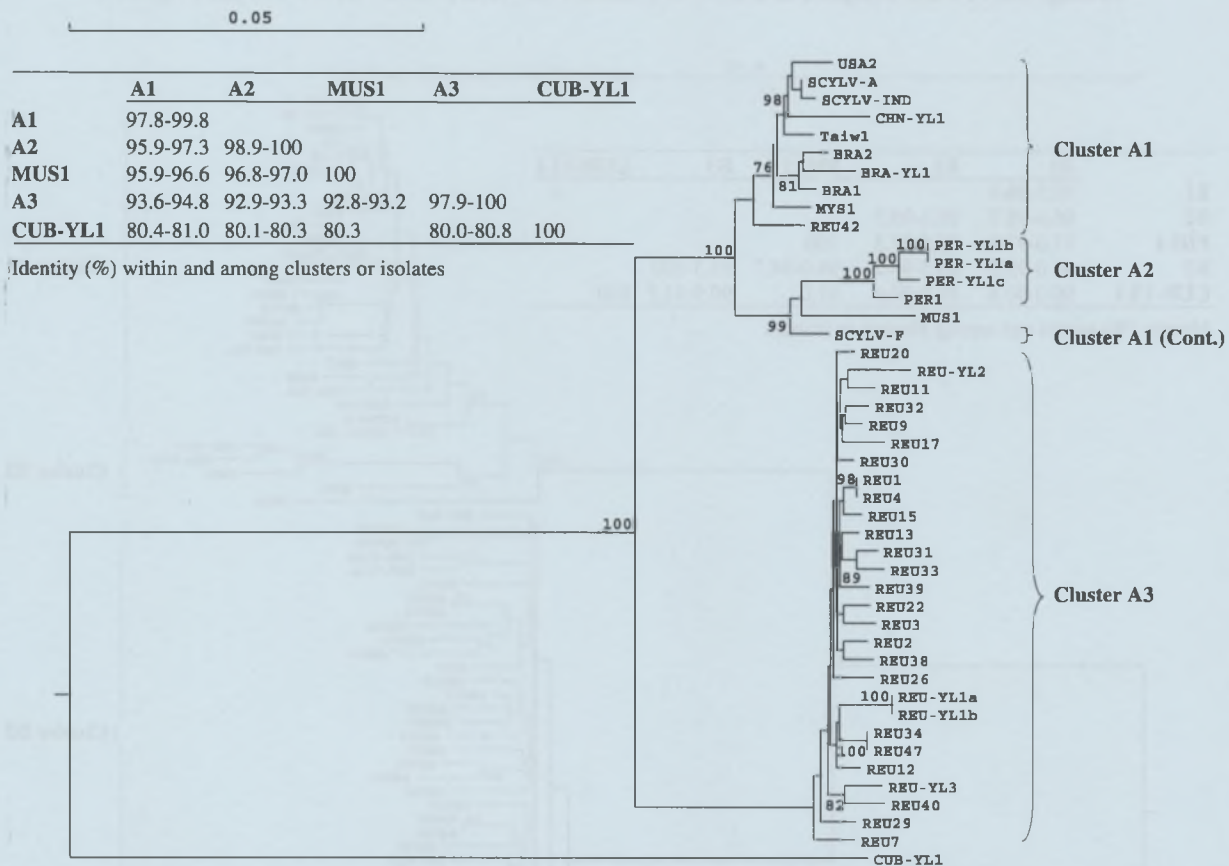


Fig. 2. Neighbor-joining tree of fragment A (partial ORFs 0 and 1) nucleotide sequences of 42 SCYLV isolates. Only bootstrap values higher than 70% are displayed at nodes (from 1000 bootstrap re-samplings). Letters a–c and a–b that follow isolate names PER-YL1 and REU-YL1, respectively, indicate amplicon sequences obtained with different RNA extractions of each virus isolate. Scale bar units are in number of substitutions per nucleotide

At least two independent RT-PCR reactions were performed for the samples that yielded no amplicon for a given target sequence.

In order to obtain the complete sequence of the 6 ORFs of five SCYLV isolates (CHN-YL1, BRA-YL1, PER-YL1, REU-YL1, REU-YL2), three additional fragments (Y1, Y4, and Y6) were amplified. The RT-PCR program was the one described above for fragment A but with primers ORF0FOR and ORF0REV (fragment Y1), BFOR and BREV (fragment Y4), and Y6F-PER or ORF5FOR and ORF5REV (fragment Y6) (Table 2 and Fig. 1).

Cloning and sequencing

RT-PCR products were cloned with the pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega) or the TOPO TA Cloning[®] kit for sequencing (Invitrogen) using the manufacturers' protocols. Competent *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed with the recombinant plasmids and plasmid DNA was then extracted using the QIAprep[®] Spin kit (Qiagen). Inserts were sequenced by Genome Express (Grenoble, France) using the Applied Biosystems 3700 sequencer and the BigDyeTerminators premix according to Applied Biosystems protocol. The sequencing primers were pUC/M13 Forward and pUC/M13 Reverse. Internal primers of fragment A were designed and used to sequence the entire clone. One clone per amplicon

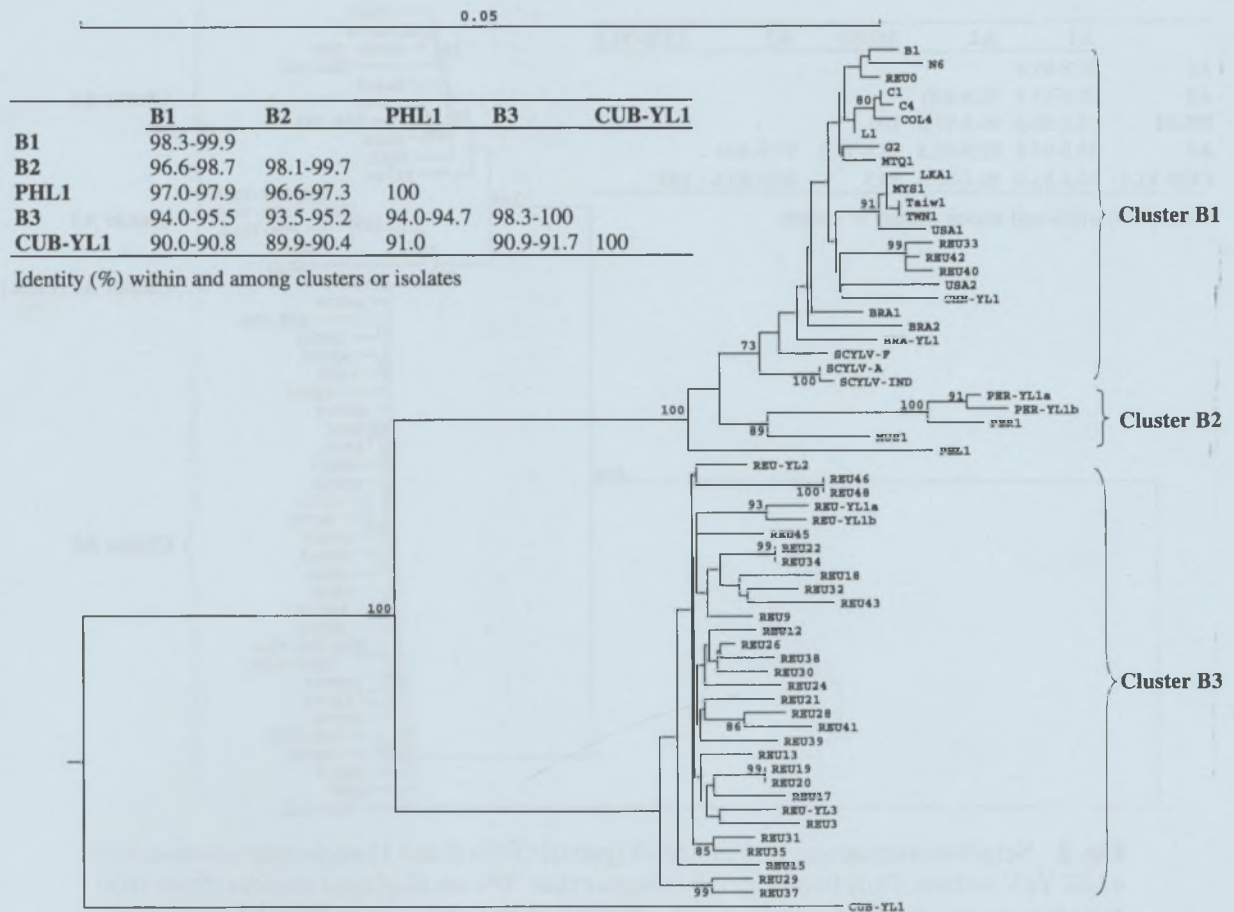


Fig. 3. Neighbor-joining tree of fragment B (partial ORFs 1 and 2) nucleotide sequences of 61 SCYLV isolates. For further details see Fig. 2

Distinct SCYLV genotype on Réunion Island

was sequenced and used for sequence alignment and phylogenetic analyses. To verify reproducibility of data, two to three amplicons obtained with different RNA extractions of the same virus isolate were cloned and sequenced for two isolates (PER-YL1 and REU-YL1). These sequences were identified by the letters a–c after the name of the virus isolate. The GenBank accession numbers of the sequences determined here and used for phylogenetic analyses are listed in Table 1.

Phylogenetic analyses

Sequences obtained from each of the four genome fragments (amplicon without primer sequences) were used for phylogenetic analyses of the 43 SCYLV isolates from Réunion Island and 17 isolates from other geographic locations. Additional sequences for the same regions of the genome were obtained for 11 other SCYLV isolates (B1, C1, C4, G2, L1, maia, N6, SCYLV-A, SCYLV-F, SCYLV-IND, and Taiw1) from the GenBank data library (Table 1). Sequences for all four fragments were, however, only available for isolates SCYLV-A, SCYLV-F, SCYLV-IND, and Taiw1. Sequences obtained for all six ORFs were used for phylogenetic analyses of SCYLV isolates CHN-YL1, BRA-YL1, PER-YL1, REU-YL1, and REU-YL2. Additional sequences of complete genomes were obtained for three other SCYLV isolates (A, F, IND) from the GenBank data library (Table 1). All sequences were aligned and a contiguous 5612-bp (ORFs 0–5) sequence was obtained for each of the eight isolates. Sequences were aligned and analyzed with DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada). Jukes-Cantor's model was used to correct distances for multiple substitutions, and phylogenetic trees were constructed by the Neighbor-Joining

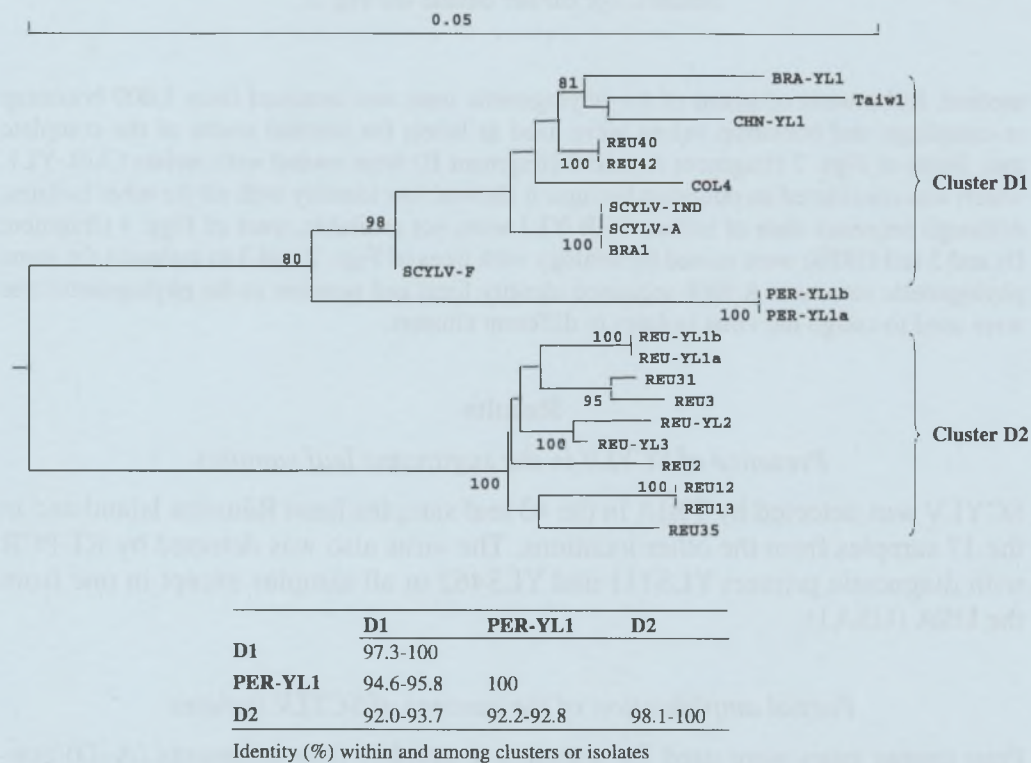
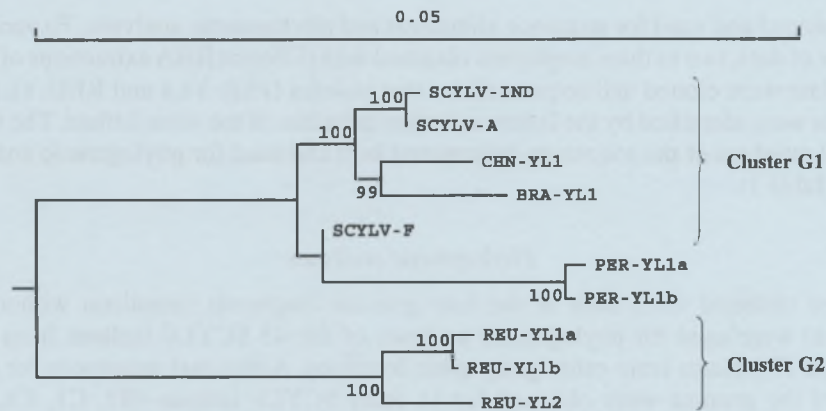


Fig. 4. Neighbor-joining tree of fragment D (partial ORF5) nucleotide sequences of 20 SCYLV isolates. For further details see Fig. 2



	G1	PER-YL1	G2
G1	98.6-99.9		
PER-YL1	96.7-98.5	99.8	
G2	94.2-95.5	93.9-94.1	98.9-99.8

Identity (%) within and among clusters or isolates

Fig. 5. Neighbor-joining tree of ORFs 0-5 (5612 bp) nucleotide sequences of 8 SCYLV isolates. For further details see Fig. 2

method. Robustness of nodes of the phylogenetic trees was assessed from 1,000 bootstrap re-samplings and bootstrap values were used as labels for internal nodes of the complete tree. Trees of Figs. 2 (fragment A) and 3 (fragment B) were rooted with isolate CUB-YL1, which was considered an outgroup because it showed low identity with all the other isolates. Although sequence data of isolate CUB-YL1 were not available, trees of Figs. 4 (fragment D) and 5 (all ORFs) were rooted by analogy with trees of Figs. 2 and 3 to maintain the same phylogenetic structure. A 98% sequence identity limit and position in the phylogenetic tree were used to assign the virus isolates to different clusters.

Results

Presence of SCYLV in the sugarcane leaf samples

SCYLV was detected by TBIA in the 43 leaf samples from Réunion Island and in the 17 samples from the other locations. The virus also was detected by RT-PCR with diagnostic primers YLS111 and YLS462 in all samples except in one from the USA (USA1).

Partial amplification of the genome of SCYLV isolates

Four primer pairs were used for attempts to amplify four fragments (A-D) containing sequences from each of the six ORFs in the genome of 60 SCYLV isolates (Table 2 and Fig. 1). Fragments A (partial ORFs 0 and 1), B (partial ORFs 1 and 2),

C (partial ORFs 3 and 4) and D (partial ORF5) were amplified for 55 out of 60 (92%), 54 out of 60 (90%), 53 out of 60 (88%), and 25 out of 60 (42%) SCYLV isolates, respectively. All amplicons were cloned and most were sequenced. Thirty-eight, 51, and 16 sequences usable for phylogenetic studies were obtained for fragments A, B, and D, respectively. Additional sequences obtained with different RNA extractions of a single isolate were also available for isolates PER-YL1 and REU-YL1. Sequences of fragment C were determined for only 35 virus isolates because this fragment appeared relatively conserved in preliminary studies. Additionally, a region of 25 nucleotides (from nucleotide 4,241 to nucleotide 4,265) of ORF3 encoding the coat protein could not be sequenced for unknown reasons. Consequently, only the 5' part of fragment C (85%) was used for the phylogenetic studies. Sequences of fragments A, B, C, or D could not be determined for some isolates because of difficulties in cloning or sequencing. Additional sequences of one or more of fragments A–D were obtained for 12 isolates of SCYLV from the GenBank data base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), but only 11 were used for phylogenetic studies (Table 1). The sequence for isolate C3 from Colombia (accession number AF369928) was not used because it contained too many variable nucleotides (125 out of 2,835) for several clones of this isolate.

Diversity of sequences and clustering of SCYLV isolates

Base differences between sequences were distributed throughout the entire genome, and no deletion or insertion zone was found in any of the four amplified fragments. Forty-two virus isolates clustered into three major groups by phylogenetic analysis of the sequences of fragment A (Fig. 2). Cluster A1 contained 11 isolates from various origins (Brazil, China, India, Malaysia, Taiwan, and USA) and one from Réunion Island (REU42). Cluster A2 contained two isolates from Peru (PER-YL1 and PER1) and all sequences of isolate PER-YL1 obtained with different RNA extractions of this latter isolate. Cluster A3 was formed by 27 isolates that all originated from Réunion Island. The two sequences obtained with different RNA extractions of isolate REU-YL1 were 100% identical. Identity between the three clusters varied between 93.6 and 97.3%. Two isolates from Mauritius (MUS1) and Cuba (CUB-YL1) were not included in any of the three clusters. MUS1 was relatively close to SCYLV-F (cluster A1) and isolates of cluster A2 but showed less than 98% identity with these isolates (Fig. 2). The identity of isolate CUB-YL1 was lower than 82% with each of the other 41 isolates.

Sixty-one virus isolates were distributed in three major groups by phylogenetic analysis with sequences of fragment B (Fig. 3). Cluster B1 included 21 isolates from various locations and four isolates from Réunion island (REU0, REU33, REU40, and REU42). Cluster B2 was formed by one isolate from Mauritius (MUS1) and two from Peru (PER1 and PER-YL1). Cluster B3 contained 31 isolates that all originated from Réunion Island. Identity between the three groups varied between 94.0 and 98.7%. Cluster B1 also contained several subgroups with very high bootstrap values, such as the subgroup formed by three isolates from Réunion Island (REU33, REU40, and REU42) and the subgroup containing

two isolates from Florida (SCYLV-A) and India (SCYLV-IND). The sequences of isolates PER-YL1 and REU-YL1, each obtained from different RNA extractions, were distributed in the same subgroups with high bootstrap values (91–93) in clusters B2 and B3, respectively. One single isolate from the Philippines (PHL1) was relatively close in sequence identity to the isolates of clusters B1 and B2, but it showed less than 98% identity with these isolates (Fig. 3). Identity of isolate CUB-YL1 was lower than 92% with each of the other 59 isolates.

Sequence identity of fragment C of 34 isolates from Réunion Island and other geographic locations was higher than 98% and these isolates all belonged to the same phylogenetic cluster (data not shown). Several isolates showed identical sequences although originating from different locations (Brazil, Colombia, Florida, India, and Louisiana).

Nineteen isolates were distributed into two major groups following phylogenetic analysis of the sequences of fragment D (Fig. 4). Cluster D1 was formed by 10 isolates from various locations (Brazil, China, Colombia, India, Taiwan, and USA), including two isolates from Réunion Island (REU40 and REU42). Cluster D2 contained nine isolates that all originated from Réunion Island. Identity among the two groups varied between 92.0 and 93.7%. Isolate PER-YL1 from Peru was closest to isolates of cluster D1, but it showed less than 96% identity with these isolates (Fig. 4). The two sequences obtained with different RNA extractions of isolate PER-YL1 were identical. The same result was obtained with the two sequences of isolate REU-YL1.

Variability of the entire translated genome of SCYLV

Sequences of fragments A–D and three additional fragments (Y1, Y4, and Y6, Fig. 1) from the genome of SCYLV were obtained for five virus isolates (BRA-YL1, CHN-YL1, PER-YL1, REU-YL1, and REU-YL2). These seven fragments covered the six ORFs of the SCYLV genome. Phylogenetic analysis of the ORFs 0 to 5 sequences available for the five virus isolates and the SCYLV isolates A, F, and IND from GenBank revealed that these eight isolates were distributed in two major groups (Fig. 5). Cluster G1 was formed by five isolates from Brazil (BRA-YL1), China (CHN-YL1), Florida (SCYLV-A and SCYLV-F), and India (SCYLV-IND). Cluster G2 contained two isolates from Réunion Island (REU-YL1 and REU-YL2), including the two sequences obtained for isolate REU-YL1 from two different RNA extractions. Isolate identity among groups G1 and G2 varied between 94.2 and 95.5%. Isolate PER-YL1 from Peru, although it showed 96.7–98.5% sequence identity with isolates of group G1, formed a separate lineage. Additionally, the two sequences obtained for this isolate with two different RNA extractions were 99.8% identical.

Discussion

SCYLV was detected by TBIA in 60 of the infected leaf samples and in 59 of the samples by RT-PCR with primers YLS111 and YLS462. These primers hybridise

within the coat protein region (ORF3) and are commonly used for molecular diagnosis of yellow leaf caused by SCYLV [6, 7, 18, 23]. In contrast, the number of samples that yielded an RT-PCR product with any of the four other primer pairs, located in different parts of the genome, was much lower: from 42% for fragment D to 92% for fragment A. These results suggest world-wide genetic variability in SCYLV. Additionally, although amplicons were obtained, several fragments could not be cloned or sequenced, again indicating considerable variation or that the primers and/or experimental protocols were not optimized. Redesign of primers and protocols will be necessary to sequence the missing genome segments and/or the entire genome of several SCYLV isolates. In this study, amplification of fragment Y6, used to obtain the entire sequence of isolate PER-YL1 (see below), required the redesign of a specific primer (Table 2).

Occurrence of genetic diversity within SCYLV was already shown by Borg et al. [3] and Moonan and Mirkov [16]. However, these studies included only virus isolates from the Americas or were based only on genomic fingerprinting. This study included sequence data of a world-wide collection of SCYLV isolates and numerous isolates from a single location (Réunion Island). Phylogenetic analyses of sequences from amplified fragments A–D confirmed that variability exists among isolates of SCYLV. Based on sequence identities between virus isolates, fragments A, B, and D, covering ORFs 0, 1, 2, and 5 were the most variable. Additionally, variability in ORF2 may be underestimated because fragment B contains parts of both ORF1 and ORF2 that overlap (Fig. 1), and this overlap will restrict the diversity in this region since the two reading frames must be maintained. The least variable fragment (more than 98% identity between 34 isolates) was fragment C. This genome segment covered ORFs 3 and 4, which code for the coat protein and a movement protein, respectively. Homogeneity of these latter ORFs is in agreement with similar results obtained for other members of the family *Luteoviridae* [14].

Depending on the genomic region analyzed, the virus isolates were either classified into one to three phylogenetic clusters, or differentiated as unique genotypes (Figs. 2–4). The majority of SCYLV isolates from Réunion Island always grouped in a single cluster (A3, B3, and D2), with the exception of fragment C as mentioned above. These clusters did not contain any isolates from other geographic origins. Cluster A3 and B3 contained, respectively, 27 out of the 28 (96%) and 31 out of the 35 (89%) analyzed sequences for isolates from Réunion Island. Yellow leaf of sugarcane on the island of Réunion therefore appears to be mainly caused by a distinct lineage of SCYLV. This was confirmed by the analysis of a sequence of 5612 bp covering ORFs 0 to 5. This fragment represented the entire translated sequence of the virus and more than 95% of the SCYLV genome (only 5' and 3' untranslated regions were missing). Phylogenetic analysis separated eight isolates of SCYLV into two groups and a single isolate (Fig. 5). The two isolates from Réunion Island forming group G2 showed only 94.2 to 95.5% identity with the closest group of isolates (G1). Similarly, isolate PER-YL1 from Peru, although relatively close to isolates of group G1 (96.7–98.5% sequence identity), clearly formed a separate lineage. We therefore suggest that each of these

two groups of isolates and isolate PER-YL1 represent different genotypes of the pathogen, and that SCYLV consists of at least three different genotypes: BRA (for Brazil, the location where the disease was initially described and where it caused significant yield losses), PER (for Peru, first location where this genotype was described) and REU (for Réunion Island, first location where this genotype was described). We can assume that other genotypes of SCYLV exist because several isolates such as CUB-YL1 (from Cuba), MUS1 (from Mauritius), and PHL1 (from the Philippines) showed low identity when compared to REU and BRA in one or more fragments amplified from the genome (Figs. 2–5). More virus isolates from each geographic location should therefore be studied to further characterize the genetic diversity within SCYLV and to investigate its spatial phylogenetic variation. Furthermore, it is also questionable whether isolate CUB-YL1 belongs to SCYLV or should be regarded as an isolate of another virus species. CUB-YL1 shared ORF1 amino-acid sequence identities of only 77–80% with isolates representative of genotypes BRA, REU, and PER (data not shown). Although such differences meet one (“differences in amino acid sequences of any gene product of greater than 10%”) of the species demarcation criteria in the family *Luteoviridae* [8], sequence analysis of the entire CUB-YL1 genome will be required before CUB-YL1 can be putatively identified as an isolate of a new virus species.

With the exception of isolates PER-YL1 and REU-YL1, only one clone per amplicon was sequenced and used for alignment and phylogenetic analysis. This could have biased results because potential *in vitro* RT-PCR errors were treated as correct data. However, several results suggested that potential RT-PCR errors did not significantly affect the main conclusions of this study. The sequences obtained with two different RNA extractions of isolates PER-YL1 and REU-YL1 showed that results were reproducible. For a given fragment, the identity of the two sequences of each isolate was at least 99.5%, and sometimes identical. Additionally, using only one clone per amplicon did not provide any information whether the sequence represented the most prevalent isolate infecting the sugarcane plant and mixed infections would not be identified. However, mixed infection did not seem to prevail in our collection of SCYLV isolates because (i) 23 virus isolates were classified in the same phylogenetic groups based on either fragment A or fragment B (Figs. 2 and 3) and (ii) only 0–3 mismatches were observed in the 308-bp overlapping sequence of these two fragments. Additionally, the overlapping sequences of the seven fragments (Fig. 1) of the five isolates chosen for full sequence analysis were 99.6% identical (Fig. 5). In contrast, classification of isolates REU33 and REU40 varied according to fragments A and B (Figs. 2 and 3), and 21–23 mismatches were found in the 308-bp overlapping sequence of the two fragments. These results suggest mixed infection of genotypes REU and BRA in sugarcane plants infected by isolates REU33 and REU40. Interestingly, similar results were obtained with isolate REU-YL3, which was initially chosen for sequencing of all ORFs. This isolate and isolate REU40 were found in the same field from sugarcane cultivar SP71-6163 imported into Réunion Island from Brazil in December 1987. Fragments A–D and Y1 of isolate REU-YL3 showed higher identity with corresponding sequences of isolates belonging to genotype

REU, whereas fragments Y4 and Y6 showed higher identity with corresponding sequences of isolates belonging to genotype BRA (data not shown). This result suggests a mixed infection with two genotypes of SCYLV. Alternatively, cultivar SP71-6163 could be infected with a recombined isolate of SCYLV because RNA recombinations frequently occur in luteoviruses [5].

Sugarcane is not a native plant of Réunion Island and was introduced into this location about 315 years ago [9]. Introduction of SCYLV from another geographic location is likely, as no naturally occurring secondary host of the virus has been identified [11, 23]. Genotype REU may have been introduced from a location not covered by this study, or it can be hypothesized that SCYLV entered Réunion Island as another genotype (genotype BRA via cultivar SP71-6163 for example) several years before yellow leaf was described and diagnosed for the first time in this location. After the spread of SCYLV to other cultivars via insect vectors, SCYLV may have evolved toward genotype REU, which is now widespread on the island. SCYLV would, therefore, have rapidly evolved following a founder effect after its introduction into Réunion Island. A similar phenomenon was suggested for Réunion isolates of maize streak virus (MSV), another virus infecting gramineous plants [17]. Similarly, SCYLV isolates or genotypes occurring in other sugarcane growing locations may not have necessarily originated in these locations. Available evidence favours the hypothesis that SCYLV spreads only from sugarcane to sugarcane. On this basis, SCYLV genotypes identified in Brazil, Colombia, Cuba, and Peru, or elsewhere may have been introduced via infected planting material imported from elsewhere. Proximity to inoculum sources and aphid vector population dynamics may be of equal or greater importance to the nucleotide changes in producing new SCYLV genotypes.

The nature and expression of yellow leaf symptoms vary between sugarcane-growing areas. The abaxial surface of leaf midribs is rarely bright yellow in diseased sugarcane in Peru [1], which differs from the characteristic symptom of yellow leaf caused by SCYLV [7, 12, 24]. Symptoms generally appear at maturity of sugarcane but were observed in young canes 6 to 8 months of age in Peru [1]. Yield reductions were attributed to SCYLV in Louisiana, where visible symptoms of yellow leaf are rarely observed [10]. In contrast, severe disease symptoms were associated with yield losses in cultivar SP71-6163 grown in Brazil [4, 28]. Variability in disease progress and severity can be due to different environmental conditions or other biotic or abiotic factors, but also to variation in the pathogen. Our study showed that significant genetic variation exists among SCYLV isolates, but further studies are needed to study the biological significance of this diversity.

Acknowledgments

We thank Jean-François Bousquet, Marc Muller and Rémy Habas (Sugarcane quarantine of Cirad, Montpellier, France), and Jorge Victoria (CENICAÑA, Colombia) for supplying sugarcane samples infected by SCYLV. We also thank Jean-Claude Girard for fruitful discussions. This research was conducted during the thesis scholarship programs of Y. Abu Ahmad,

supported by the Government of Syrian Arabic Republic, and of L. Rassaby, supported by the Région Réunion.

References

1. Alegria OM, Chatenet M, Girard J-C, Saldarriaga SA, Nuget A, Rott P (2000) First report of *Sugarcane yellow leaf virus* in Peru. *Plant Dis* 84: 1342
2. Borg Z, Gibbs M, Lockhart B, Braithwaite K, Smith G (1999) Sugarcane yellow leaf virus: a novel recombinant virus from the *Luteoviridae*. In: Proc, XIth International Congress of Virology, Sydney 1999. International Union of Microbiological Societies, Sydney, p 47 (VW15.02:47)
3. Borg Z, Moonan F, Braithwaite K, Mirkov TE, Smith G (2001) Characterising the genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus*. In: Proc, 24th International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Brisbane 2001. The Australian Society of Sugar Cane Technologists, Mackay, pp 654–656
4. Burnquist WL, Vega J (1996) Sugarcane diseases in southern Brazil: a brief report. In: Croft BJ, Piggitt CM, Wallis ES, Hogarth DM (eds) *Sugarcane germplasm conservation and exchange*, ACIAR Proc No. 67. The Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp 59–61
5. Chaloub BA, Lapiere HD (1995) Importance des recombinaisons ARN dans l'évolution des *Luteovirus*. *Agronomie* 15: 393–400
6. Chatenet M, Delage C, Ripolles M, Irey MS, Lockhart BEL, Rott P (2001) Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis* 85: 1177–1180
7. Comstock JC, Irey MS, Lockhart BEL, Wang ZK (1998) Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane* 4: 21–24
8. D'Arcy CJ, Domier LL (2005) *Luteoviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, pp 343–352
9. Girard J-C, Payet J (1997) La maîtrise des maladies de la canne à sucre à La Réunion: un effort continu de lutte depuis plus de soixante ans. In: Proc, 4^e congrès international de l'Association réunionnaise pour le développement de la technologie agricole et sucrière (ARTAS) et 2^{es} rencontres en langue française de l'Association française de la canne à sucre (AFCAS), Saint-Denis, La Réunion, 1997. ARTAS, Saint-Denis, pp 249–259
10. Grisham MP, Pan YB, White WH, Godshall MA, Legendre BL, Comstock JC (2002) Potential effect of yellow leaf syndrome on the Louisiana sugarcane industry. *J Am Soc Sugar Cane Technol* 22: 125–126
11. Lehrer AT, Schenck S, Fitch MMM, Moore PH, Komor E (2001) Distribution and transmission of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in Hawaii and its elimination from seedcane. In: Proc, 24th International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Brisbane 2001. The Australian Society of Sugar Cane Technologists, Mackay, pp 439–443
12. Lockhart BEL, Cronjé CPR (2000) Yellow leaf syndrome. In: Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS (ed) *A guide to sugarcane diseases*. La Librairie du Cirad, Montpellier, pp 291–295
13. Maia IG, Gonçalves MC, Arruda P, Vega J (2000) Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. *Arch Virol* 145: 1009–1019

14. Mayo MA, Miller WA (1999) The structure and expression of Luteovirus genomes. In: Smith HG, Barker H (ed) *The Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp 23–42
15. Moonan F, Molina J, Mirkov TE (2000) *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* 269: 156–171
16. Moonan F, Mirkov TE (2002) Analyses of the genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*. Evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *J Virol* 76: 1339–1348
17. Peterschmitt M, Granier M, Frutos R, Reynaud B (1996) Infectivity and complete nucleotide sequence of the genome of a genetically distinct strain of *Maize streak virus* from Réunion Island. *Arch Virol* 141: 1637–1650
18. Rassaby L, Girard J-C, Irely MS, Lockhart BEL, Rott P (1999) Survey of sugarcane yellow leaf syndrome in Réunion Island. *Sugar Cane* 10: 16–18
19. Rassaby L, Girard J-C, Lemaire O, Costet L, Irely MS, Kodja H, Lockhart BEL, Rott P (2004) Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the Island of Réunion. *Plant Pathol* 53: 117–125
20. Rassaby L, Girard J-C, Letourmy P, Chaume J, Irely MS, Lockhart BEL, Kodja H, Rott P (2003) Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. *Eur J Plant Pathol* 109: 459–466
21. Scagliusi SM, Lockhart BEL (2000) Transmission, characterisation, and serology of a *Luteovirus* associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathology* 90: 120–124
22. Schenck S (2001) Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts. In: Rao GP, Ford RE, Tosic M, Teakle DS (eds) *Sugarcane pathology*. Vol II, Virus and phytoplasma diseases. Science Publishers Inc, Enfield, NH, pp 25–35
23. Schenck S, Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Dis* 84: 1085–1088
24. Schenck S, Hu JS, Lockhart BEL (1997) Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of Sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. *Sugar Cane* 4: 5–8
25. Smith GR, Borg Z, Lockhart BEL, Braithwaite KS, Gibbs M (2000) *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *J Gen Virol* 81: 1865–1869
26. Smith HG, Barker H (1999) *The Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon
27. Van der Wilk F, Houterman P, Moltoff J, Hans F, Dekker F, Van den Heuvel JFJM, Huttinga H, Goldbach R (1997) Expression of the Potato leafroll virus ORF 0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 153–159
28. Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC (1997) Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis* 81: 21–26
29. Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer JD, Simonis MT, Herrbach E, Guilley H, Richards KE, Jonard G (1996) The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant-Microbe Interact* 9: 501–510

Author's address: Philippe Rott, CIRAD, UMR 385 BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France; e-mail: philippe.rott@cirad.fr

4.2. Distribution géographique de quatre géotypes du *Sugarcane yellow leaf virus*

Article 2

Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J.-H., Costet, L., Lett, J.-M., Victoria, J.I., Girard, J.-C., and Rott, P. 2006b. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf* genotypes. Plant Disease. (Sous Presse).

Geographical Distribution of Four *Sugarcane yellow leaf virus* Genotypes

Youssef Abu Ahmad, Monique Royer, UMR Agro.M-CIRAD-INRA Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France; **Jean-Henrich Daugrois**, UR Multiplication Végétative, CIRAD Département Cultures annuelles, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, FWI; **Laurent Costet** and **Jean-Michel Lett**, UMR CIRAD-Université de La Réunion, Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre, La Réunion; **J.I. Victoria**, CENICAÑA, Calle 58 Norte No. 3BN-110, Cali, Valle, Colombia; **Jean-Claude Girard** and **Philippe Rott**, UMR Agro.M-CIRAD-INRA Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

Corresponding author: Philippe Rott, CIRAD, UMR BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France; E-mail address: philippe.rott@cirad.fr

ABSTRACT

Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J-H., Costet, L., Lett, J-M., Victoria, J. I., Girard, J.-C., and Rott, P. 2006. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Dis.* 90:0000-0000.

Specific primer pairs were designed to distinguish four genotypes (BRA for Brazil, CUB for Cuba, PER for Peru and REU for Réunion Island) of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) by RT-PCR. A unique genome fragment was amplified from each genotype, with the exception of genotypes BRA and PER that are phylogenetically relatively close and were designated genotype BRA-PER. These RT-PCR primers were then used to identify the SCYLV genotype(s) present in 18 different sugarcane growing locations in the world, and 245 leaf samples infected by the virus were analyzed. Most samples were infected by only one of the three genotypes, but mixed infections occurred. Genotype BRA-PER was found in all sugarcane growing locations, whereas genotypes CUB and REU were each found in four geographical locations only. Genotypes BRA-PER, CUB and REU were all three detected in locally bred sugarcane cultivars in Guadeloupe, indicating local transmission of these genotypes. In contrast, only genotypes BRA-PER and CUB were found in locally bred cultivars in Brazil, whereas genotype REU was detected in this country in cultivar R570 imported from Réunion. Similarly, genotypes BRA-PER and REU are both present in Reunion, but genotype BRA-PER has not, as of yet, spread on this island. Presence of several SCYLV genotypes in Brazil, Colombia, Guadeloupe, Mauritius and Reunion suggests different virus introductions and/or different evolution histories of the virus after its introduction into a new environment.

Additional keywords: *Saccharum* spp.

Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) is the causal agent of yellow leaf of sugarcane (*Saccharum* spp.), a disease previously called yellow leaf syndrome or YLS (28,29). Yellow leaf was first reported in Hawaii and in Brazil in the late 1980s and early

1990s (30,33), and it has since been reported in more than 30 sugarcane producing countries worldwide (4,20). The incidence of SCYLV in commercial fields can reach 100% in susceptible cultivars (6,7,25,34), and the disease can cause significant yield losses in susceptible cultivars even if infected plants do not exhibit overt disease symptoms (8,15,27,33).

A characteristic symptom of the disease is an intense yellowing of the leaf midrib on the abaxial surface of mature leaves, and this discoloration often occurs while the lamina is still green. In some sugarcane cultivars, leaves show a red coloration of the midrib on the adaxial surface. The leaf blade can then become bleached, proceeding from the tip toward the base of the leaf. Dwarfing of terminal internodes and tissue necrosis can also eventually be observed. Infected plants show a reduction of sucrose in stalks and an increase of sucrose accumulation in midribs (10,13). Symptoms appear sometimes only when infected canes are stressed (17). However, most of these symptoms may be related to other biotic or abiotic factors like stress conditions, insect damage, water logging and cool winters (5,20). The virus resides in the phloem tissue of plants and is transmitted during vegetative propagation of sugarcane by planting infected cuttings (19,26,29,32). SCYLV is transmitted from plant to plant by the aphid vectors *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* and *R. rufiabdominalis* in a persistent, circulative and non-replicative manner (21,29,32).

SCYLV has recently been assigned to the genus *Polerovirus* of the family *Luteoviridae* (9) and several genetic diversity studies showed that SCYLV is a variable virus (1,2,22). Based on phylogenetic analyses of sequences of the entire translated genome of SCYLV, Abu Ahmad et al. (1) described the occurrence of three different genotypes (BRA, PER and REU) within 8 virus isolates from world-wide locations. The name given to each of these genotypes was based on the geographical location where it was first detected: Brazil, Peru and Reunion, respectively. Sequence identity varied from 94.2-95.5% among isolates of genotypes BRA and REU, and from 93.9-94.1% among isolates of genotypes PER and REU. Although genotype PER isolates showed 96.7-98.5% sequence identity with genotype BRA isolates, genotype PER formed a separate lineage. Additionally, a virus isolate from Cuba, that was partially sequenced, showed only 77-80% amino-acid sequence identity in ORF1 with isolates of genotypes BRA,

REU and PER. This result suggested that the Cuban isolate represented another genotype or even an isolate of a new virus species (1). In the study herein, this virus isolate will be considered as another genotype of SCYLV and called CUB for Cuba.

The objective of our study was to analyze the distribution and incidence of SCYLV genotypes BRA, CUB, PER and REU in different geographical locations in the world. We report here the design of specific primers to identify genotypes BRA (or PER), CUB and REU by RT-PCR, and the genotyping of SCYLV in 245 leaves infected by the virus and collected from 18 sugarcane growing locations from four continents (North and South America, Asia and Africa).

MATERIALS AND METHODS

Infected plant material and RNA extraction. Leaves infected by SCYLV were collected from Cirad's sugarcane quarantine (3) or directly from diseased fields (Table 1). Tissue blot immunoassay (TBIA) and RT-PCR were used to verify the presence of SCYLV in leaf samples. TBIA was performed as described by Schenck et al. (31), Fast Blue BB salt (Sigma®) were used. RT-PCR with diagnostic primers YLS111 and YLS462 (1) and Ready-to-go-Beads kit (Amersham) was performed as described by Comstock et al. (4). The amplified fragment from the coat protein coding sequence has an expected size of 351 bp (fragment YLS, Fig. 1). Leaves were stored at -80 °C until RNA extraction. Total RNA was extracted and purified from sugarcane leaves (100 mg of lamina and midrib) with the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total RNA was eluted in a final volume of 40 µl of diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water and stored at -20 °C.

SCYLV genome sequences and design of specific primer pairs for SCYLV genotyping. Sequences of the entire translated genome of 10 SCYLV isolates available in the GenBank data library (Accession numbers AM072750, AM072751, AM072752, AM072753, AM072754, AM072755, AM072756, AF157029, AJ249447, AY236971) and sequences of additional 5 SCYLV isolates (Abu Ahmad, Monique Royer et Philippe Rott., unpublished data) were used. Sequences were aligned and analysed with DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada). A

contiguous 5,609-5,612 bp (ATG ORF0 to stop codon ORF5) sequence was obtained for all 15 isolates. Genome regions that showed nucleotide variation between genotypes BRA, CUB, PER and REU were used to design primers for RT-PCR amplification of a distinct fragment from each genotype. These primers were also tested in combination with non selective primers which were previously described (1).

Amplification of a specific genome fragment from each SCYLV genotype by RT-PCR. A distinct fragment for each genotype was amplified by RT-PCR using the Titan One Tube RT-PCR System kit (Roche) and primers pairs that were located in different locations of the viral genome (Table 2 and Fig. 1). The same RNA template was used for all RT-PCR reactions performed with a given virus isolate. The 25 µl RT-PCR reaction mix consisted of 1 µl eluted RNA, 5 µl RT-PCR buffer (5x), 1.25 µl DTT solution (100 mM), 0.25 µl RNase inhibitor (40 U µl⁻¹), 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 µl Titan enzyme mix, 0.05 µl of each primer (100 µM), and DEPC water to final volume. The same RT-PCR program was used for all SCYLV genotypes: 56°C for 60 min, 94°C for 2 min, 30 cycles at 94°C for 15 sec, 61°C for 2 min and 68°C for 2 min with a final 68°C extension for 10 min. A 10-µl aliquot of each amplification product was analyzed through a 1.0% agarose gel by electrophoresis in TBE buffer, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. The amplification product of SCYLV genotypes BRA (or PER), CUB and REU had expected sizes of 362 bp, 450 bp and 905 bp, respectively (Table 2 and Fig. 2).

RESULTS

Selection of specific RT-PCR primers for identification of SCYLV genotypes.

Several primer pairs were tested to distinguish SCYLV genotypes BRA, CUB, PER and REU by selective amplification of a distinct genome fragment (data not shown). Virus isolates representative of each genotype were used and at least one specific primer pair was successfully identified per genotype to differentiate the four genotypes, with the exception of genotypes BRA and PER which are phylogenetically relatively close (Table 2). The primer pair designed and chosen for amplification of genotype BRA isolates also amplified the two known isolates of genotype PER from Peru. Genotype BRA-PER will therefore be used below to designate this group of two closely related genotypes.

Genotyping of SCYLV in 18 sugarcane growing locations. The SCYLV genotype(s) occurring in 245 infected leaf samples from 18 different sugarcane growing locations in the world was determined by RT-PCR amplification with three different primer pairs (Tables 1 and 2). Genotypes BRA-PER, CUB and REU were found in 137 (56%), 51 (21%) and 82 (33%) of the 245 samples, respectively. Mixed infections of genotypes BRA-PER + REU, BRA-PER + CUB and CUB + REU were detected in 22 (9%), 11 (4%) and 2 (1%) of the 245 samples, respectively (Fig. 2).

At least one leaf sample from each of the 18 investigated geographic locations was infected by genotype BRA-PER (Table 1). BRA-PER was the only genotype found in Barbados, China, Florida, Hawaii, Malaysia, Martinique, Peru, Philippines, Senegal, Sri Lanka, Sudan and Taiwan. Genotype CUB was found only in Brazil (in 4 of 21 samples), in Colombia (in 28 of 44 samples), in Cuba (in 4 of 5 samples) and in Guadeloupe (in 15 of 60 samples). Genotype REU was found only in Brazil (in 2 of 21 samples), in Guadeloupe (36 of 60 samples), in Mauritius (9 of 11 samples) and in Reunion Island (45 of 46 samples).

Locally bred varieties were all infected by genotype BRA-PER in Brazil (15 samples) and by genotype REU in Reunion Island (30 samples) (Table 3). Two to three genotypes were found in locally bred varieties in Colombia (BRA-PER and CUB), Guadeloupe (BRA-PER, CUB and REU) and Mauritius (BRA-PER and REU). SCYLV genotype CUB showed the highest incidence in locally bred varieties in Colombia where 22 of 26 samples (84%) were infected by this genotype. In Guadeloupe, genotype REU was the most common and 18 of 29 samples (62%) collected from locally bred varieties

were infected by this genotype.

DISCUSSION

These three genotypes of SCYLV are not distributed uniformly in the world. Genotype BRA-PER was found in 18 sugarcane growing locations in Africa, Asia, North, Central and South America, whereas genotypes CUB and REU were found in only four locations each. World distribution of genotype BRA-PER suggests that yellow leaf was originally caused by this genotype that was spread worldwide by infected plant material, when the causal agent of yellow leaf was unknown and not intercepted in sugarcane quarantines (3). Although genotype BRA-PER is present all around the world, its incidence varied according to the sugarcane growing location. It was found in all sampled sugarcane varieties in Barbados, Brazil, China and Florida but, in Réunion Island, it was only detected in an imported foreign variety. This latter variety was initially thought to be SP71-6163, the variety severely affected by yellow leaf in Brazil (21,33), but recent genomic fingerprinting showed that this variety was mislabeled (J. Pauquet, pers. communication). Several reasons may explain the absence of spread of genotype BRA-PER in Réunion Island. This SCYLV genotype may have only recently been imported to this location highly contaminated by SCYLV (25,26), and has not been significantly spread yet because of limited inoculum source. It can also be hypothesized that insect vectors present in Réunion Island do not efficiently spread genotype BRA-PER or that the local environment is not favorable to genotype BRA-PER. A similar situation occurs in Brazil where genotype REU was detected in variety R570 imported from Réunion Island, but not in locally bred varieties. Strain specific transmission has been reported for other viruses of the *Luteoviridae* family such as *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (12,14,24,35) and *Potato leafroll virus* (PLRV) (18). In contrast, in Colombia and Guadeloupe, two (BRA-PER and CUB) and three (BRA-PER, CUB and REU) genotypes were detected in locally bred sugarcane varieties, respectively, which proved local transmission of all these genotypes because no diseases are known to be transmitted through the caryopsis of the sugarcane fruit (11). Local transmission of SCYLV genotypes BRA-PER, CUB and REU in Guadeloupe was also demonstrated by the detection of these genotypes in sugarcane fields several months after planting of healthy

tissue-cultured plants (data not shown). Several genotypes of SCYLV can therefore co-exist in a geographical location, but also in a sugarcane plant as demonstrated by the detection of mixed genotype infections in a few samples.

Genotype CUB was only found in South America (Brazil, Colombia and Cuba) and in Guadeloupe. Genotype REU was only found in locally bred varieties in Guadeloupe, Mauritius and Reunion Island. The limited geographical distribution of these two genotypes might be due to specific pathogen x host x vector x environment interactions, and therefore different evolution histories. Future surveys and genotyping studies in the geographical locations sampled in this study should supply useful data regarding evolution of SCYLV populations.

Because *Saccharum* species (including traditional and modern sugarcane cultivars and wild relatives) are the only known natural hosts of SCYLV (19,20,32), and because these species (with the exception of some *S. spontaneum* clones in part of Africa) are not native to the Americas, Africa or the Mascareines archipelago (16), SCYLV was imported into these locations from elsewhere via infected planting material. The presence of several genotypes of SCYLV in Brazil, Colombia, Guadeloupe, Mauritius and Réunion Island suggests different virus introductions. Additionally, other genotypes of SCYLV not described yet may occur in the world, especially in traditional sugarcane cultivars (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*) and wild relatives (*S. spontaneum* and *S. robustum*) not tested in this study, and the biological significance of this genetic diversity remains to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues from Barbados (WICSCBS), Brazil (COPERSUCAR and UFSCAR), China (YSRI), Cuba (INICA), Florida (USDA), Hawaii (HARC), Malaysia (KGFPSB), Martinique (CTICS), Mauritius (MSIRI), Peru (AIPSA), Philippines (PHILSURIN), Senegal (CSS), Sri Lanka (SRI), Sudan (KSC Ltd), and Taiwan (TSRI) for supplying sugarcane samples infected by SCYLV. We also thank Jean-François Bousquet, Marc Muller and Rémy Habas for collecting SCYLV infected samples in the sugarcane quarantine of CIRAD, Marie-Josée Darroussat and Emmanuel Fernandez for technical assistance, and Erik Mirkov for critical reviewing of the manuscript. This

research was conducted during the thesis scholarship program of Y. Abu Ahmad, supported by the Government of Syrian Arabic Republic.

LITERATURE CITED

1. Abu Ahmad, Y., Rassaby, L., Royer, M., Borg, Z., Braithwaite, K. S., Mirkov, E., Ireya M. S., Perrier, X., Smith, G. R., and Rott, P. 2006. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. Arch. Virol. (DOI 10.1007/s00705-005-0712-9).
2. Borg, Z., Moonan, F., Braithwaite, K., Mirkov, T. E., and Smith, G. 2001. Characterising the genetic diversity of *Sugarcane yellow leaf virus*. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 24:654-656.
3. Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Ireya M. S., Lockhart, B. E. L., and Rott, P. 2001. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. Plant Dis. 85:1177-1180.
4. Comstock, J. C., Ireya M. S., Lockhart, B. E. L., and Wang, Z. K. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. Sugar Cane 4: 21-24.
5. Comstock, J. C., Irvine, J. E. and Miller, J. D. 1994. Yellow leaf syndrome appears on the United States mainland. Sugar J. 56:33-35.
6. Comstock, J. C., Miller, J. D., and Schnell, R. J. 2001. Incidence of Sugarcane yellow leaf virus in clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United States National Repository in Miami, Florida. Sugar Tech 3(4):128-133.
7. Comstock, J. C., Miller, J. D., Tai, P. Y. P., and Follis, J. E. 1999. Incidence of and resistance to sugarcane yellow leaf virus in Florida. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 23:366-372.
8. Cronjé, C. P. R., Tymon, A. M., Jones, P., and Bailey, R. A. 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. Ann. Appl. Biol. 133:177-186.
9. D'Arcy, C. J., and Domier, L. L. 2005. Luteoviridae. Pages 891-900 in: Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C. M.

- 258 Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds. Academic Press,
259 New York.
- 260 10. Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, E. M., Armas, R., Rodriguez, C. W., Martinez,
261 M., Piñón, D., Acevedo, R. and Solas, M. T. 2003. Yellow leaf syndrome modifies the
262 composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant*
263 *Physiol. Biochem.* 41:1027-1036.
- 264 11. Frison, E. A., and Putter, C. A. J. 1993. FAO/IBPGR Technical guidelines for the
265 safe movement of sugarcane germplasm. Food and Agriculture Organization of the
266 United Nations / International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- 267 12. Gildow, F. E. and Gray, S. M. 1993. The aphid salivary gland basal lamina as a
268 selective barrier associated with vector-specific transmission of Barley yellow dwarf
269 luteovirus. *Phytopathology* 83:1293-1302.
- 270 13. Gonçalves, C M., Vega, J., Olivieira, G. J., and Gomes, M. A. M. 2005. Sugarcane
271 yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and
272 carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitopatol. Bras.* 30(1):10-16.
- 273 14. Gray, S., and Gildow, F. E. 2003. Luteovirus-aphids interaction. *Annu. Rev.*
274 *Phytopathol.* 41:539-599.
- 275 15. Grisham, M. P., Pan, Y. B., White, W. H., Godshall, M. A., Legendre, B. L., and
276 Comstock, J. C. 2002. Potential effect of yellow leaf syndrome on the Louisiana
277 sugarcane industry. *J. Am. Soc. Sugar Cane Technol.* 22:125-126.
- 278 16. Grivet, L., Daniels, C., Glaszmann, J-C., and D'Hont, A. 2004. A review of recent
279 molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobotany*
280 *Res. Appl.* 2:9-17.
- 281 17. Izaguirre-Mayoral, M. L., Carballo, O., Alceste, C., Romano, M., and Nass, H. A.
282 2002. Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected
283 sugarcane in Venezuela. *J. Phytopathol.* 150:13-19.
- 284 18. Jolly, C. A., and Mayo, M. A. 1994. Changes in the amino acid sequences of the coat
285 protein read through domain of Potato leafroll luteovirus effect the formation of an
286 epitope and aphid transmission. *Virology* 201:182-185.

- 287 19. Lehrer, A. T., Schenck, S., Fitch, M. M. M., Moore, P. H., and Komor, E. 2001.
288 Distribution and transmission of Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in Hawaii and its
289 elimination from seedcane. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 24:439-443.
- 290 20. Lockhart B. E. L., and Cronjé C. P. R. 2000. Yellow leaf syndrome. Pages 291-295
291 in: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, and
292 A. S. Saumtally, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier.
- 293 21. Lockhart, B. E. L., Irej, M. S., and Comstock, J. C. 1996. Sugarcane bacilliform virus,
294 sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. Page 134 in:
295 Sugarcane germplasm conservation and exchange, ACIAR Proceedings No 67. B. J.
296 Croft, C. M. Piggin, E. S. Wallis, and D. M. Hoggart, eds. Australian Centre for
297 International Agricultural Research, Canberra.
- 298 22. Moonan, F., and Mirkov, T. E. 2002. Analyses of the genotypic diversity among
299 North, South, and Central American isolates of Sugarcane yellow leaf virus. Evidence for
300 Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. J. Virol. 76:1339-
301 1348.
- 302 23. Moonan, F., Molina, J., and Mirkov, T. E. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an
303 emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral
304 ancestors. Virology 269:156-171.
- 305 24. Peiffer, M. L., Gildow, F. E., and Gray, S. M. 1997. Two distinct mechanisms
306 regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. J.
307 Gen. Virol. 78:495-503.
- 308 25. Rassaby, L., Girard, J. C., Irej, M. S., Lockhart, B. E. L., Kodja, H. and Rott, P.
309 2001. Yellow leaf syndrome in sugarcane cultivars of Réunion Island: Dynamics of
310 SCYLV in the field and in the plant. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 24:451-
311 455.
- 312 26. Rassaby, L., Girard, J. C., Lemaire, O., Costet, L., Irej, M. S., Kodja, H., Lockhart,
313 B. E. L., and Rott, P. 2004. Spread of Sugarcane yellow leaf virus in sugarcane plants and
314 fields on the Island of Réunion. Plant Pathol. 53:117-125.
- 315 27. Rassaby, L., Girard J-C., Letourmy P., Chaume J., Irej M. S., Lockhart B. E. L.,
316 Kodja H., and Rott P. 2003. Impact of Sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield
317 and juice quality in Réunion Island. Eur. J. Plant Pathol. 109:459-466.

- 318 28. Rott, P., Comstock, J. C., Croft, B. J., Kusalwong, A., and Saumtally, S. 2005.
319 Advances and challenges in sugarcane pathology: A review of the 2003 pathology
320 workshop. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 25:607-614.
- 321 29. Scagliusi, S. M., and Lockhart, B. E. L. 2000. Transmission, characterisation, and
322 serology of a Luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane.
323 Phytopathology 90:120-124.
- 324 30. Schenck, S. 2001. Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts.
325 Pages 25-35 in: Sugarcane pathology volume II: Virus and phytoplasma diseases. G. P.
326 Rao, R. E. Ford, M. Tosic, and D. S. Teakle, eds. Science Publishers Inc, Enfield, NH.
- 327 31. Schenck, S., Hu, J. S., and Lockhart, B. E. L. 1997. Use of a tissue blot immunoassay
328 to determine the distribution of Sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. Sugar Cane 4:5-8.
- 329 32. Schenck, S., and Lehrer, A. T. 2000. Factors affecting the transmission and spread of
330 Sugarcane yellow leaf virus. Plant Dis. 84:1085-1088.
- 331 33. Vega, J., Scagliusi, S. M. M., Ulian, E. C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in
332 Brazil: Evidence of association with a luteovirus. Plant Dis. 81:21-26.
- 333 34. Viswanathan, R. 2002. Sugarcane yellow leaf syndrome in India: Incidence and effect
334 on yield parameters. Sugar Cane Intern. 5:17-23.
- 335 35. Zavaleta, E. L., Smith, D. M. and Gray, S. M. 2001. Variation in transmission
336 efficiency among Barley yellow dwarf virus-RMV isolates and clones of the normally
337 inefficient aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. Phytopathology 91:792-796.

338 **Table 1.** Source of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) infected leaves and identification of
 339 SCYLV genotypes in 245 samples from 18 different geographical locations

Origin of sample	Sugarcane host cultivar (interspecific <i>Saccharum</i> hybrids)	SCYLV genotype	Number of samples
Barbados	B85287, B86776, B9702, BT74209, BT7748, Co6806, DB8811, DB89138	BRA-PER	8
Brazil	R570, RB80-6043, RB84-5257, RB85-5113, SP71-1406, SP71-6163, SP77-5181, SP81-1763	BRA-PER ^a	15
Brazil	RB83-5054, SP71-6163, SP81-3250, SP83-5073	BRA-PER + CUB	4
Brazil	R570	BRA-PER + REU	2
China	CGT73-167, CMT70-611, CP70-1133, CYT93-159, CYT85-1589, CYZ81-173, FR93435, ROC3	BRA-PER ^a	10
Colombia	C1616-75, CC92-2227, CC92-2376, CC92-2885, Co421, CP38-34, Ja64-20, PR77-3007, SP71-6163	BRA-PER	16
Colombia	C1051-73, C236-51, C2655-74, CC84-75, CC85-96, CC87-505, CC92-2867, CC92-2882, CC92-2885, CC93-3811, CP38-34, Mex64-1487, POJ2878	CUB	21
Colombia	CC85-96	BRA-PER + CUB	7
Cuba	Ja64-11	BRA-PER	1
Cuba	C132-81	CUB	4
Florida	CP85-1491, CP86-1633, CP89-2143, R570, TCP87-3388	BRA-PER	9
Guadeloupe	B37-161, CP67-412, FR9453, SP79-1169	BRA-PER	11
Guadeloupe	B68409, FR9707, FR9976, FR99101, FR0020, FR0048, FR00102, FR00170, SP71-6163	CUB	13
Guadeloupe	CB56-171, FR90714, FR9707, FR9856, FR9979, FR9983, FR00306, R570, R578, SP71-3146, SP71-6163	REU	32
Guadeloupe	FR99273, SP71-6163	BRA-PER + REU	2
Guadeloupe	FR9604, SP71-6163	CUB + REU	2
Hawaii	"R570" ^c	BRA-PER	5
Malaysia	TC2, TC4	BRA-PER	2
Martinique	B7623, B7656, FR91180, FR91485, FR91816	BRA-PER	5
Mauritius	M124/59, M253/58	BRA-PER	2
Mauritius	M1186/86, M2024/88, R570, SP71-	REU	6

	6163		
Mauritius	R570	BRA-PER + REU	3
Peru	H32-8560, H50-7209	BRA-PER ^b	3
Philippines	VMC71-238, VMC76-16, VMC87-599	BRA-PER	3
Réunion Island	“SP71-6163” ^c	BRA-PER	1
Réunion Island	R490, R570, R577, R84408	REU	30
Réunion Island	“SP71-6163” ^c	BRA-PER + REU	15
Senegal	CP72-2086, CP85-1491, CP86-1664, NA6390	BRA-PER	5
Sri lanka	SLC9225, SLC9272, SLC9273, SLC9294	BRA-PER	4
Sudan	KnB96207, KnB96223	BRA-PER	2
Taiwan	ROC6, ROC10	BRA-PER	2

340

341 ^a Isolates from sugarcane cultivar SP71-6163 in Brazil and cultivar CGT63-167 in China
 342 belong to genotype BRA based on the phylogenetic study of the entire translated genome
 343 of SCYLV (1).

344 ^b Isolates from sugarcane cultivar H50-7209 belong to genotype PER based on the
 345 phylogenetic study of the entire translated genome of SCYLV (1).

346 ^c Mislabeled cultivar.

347 **Table 2.** Sequence and position in the *Sugarcane yellow leaf virus* genome of the primers used for genotype identification by RT-PCR

Amplified fragment ^a	Name of primers	Genome position ^b	5'-3' sequence ^c
BRA-PER	BRA-PER-F	1,905-1,924	AACTGCTGCgtcAgGCcCa
	BRA-PER-R	2,267-2,246	GACGAGCtTGCGTTGTttttCt
CUB	CUB-F	423-443	gTGCttcTCCcgGCGGTTcact
	CUB-R	873-853	attcGaGAACAACCTcCgcctc
REU	REU-F	3,540-3,558	CAAgCTtCTAGCgGGaaTc
	B-REV ^d	4,445-4,427	CAGTTGCTCaATGCTCCAcG

348 ^a see genome location in Fig. 1)

349 ^b Position in the SCYLV complete genome (GenBank accession n° AF157029).

350 ^c Polymorphic nucleotides are written in lower case

351 ^d Primer previously described by Ahmad et al. (1).

352

353

354 **Table 3.** Genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* in locally bred and imported varieties in five sugarcane growing locations

Location	Variety type (total number of varieties)	Number of samples infected by SCYLV genotype(s)						Total number of samples	
		BRA-PER	CUB	REU	BRA-PER + CUB	BRA-PER + REU	REU + CUB		
Brazil	Locally bred RB (10)	11	0	0	4	0	0	15	21
	Imported varieties (1)	4	0	0	0	2	0	6	
Colombia	Locally bred CC (9)	4	15	0	7	0	0	26	44
	Imported varieties (11)	12	6	0	0	0	0	18	
Guadeloupe	Locally bred FR (16)	3	8	14	0	2	2	29	60
	Imported varieties (12)	8	5	18	0	0	0	31	
Mauritius	Locally bred M (4)	2	0	2	0	0	0	4	11
	Imported varieties (2)	0	0	4	0	3	0	7	
Réunion Island	Locally bred R (4)	0	0	30	0	0	0	30	46
	Imported varieties (1)	1	0	0	0	15	0	16	

355

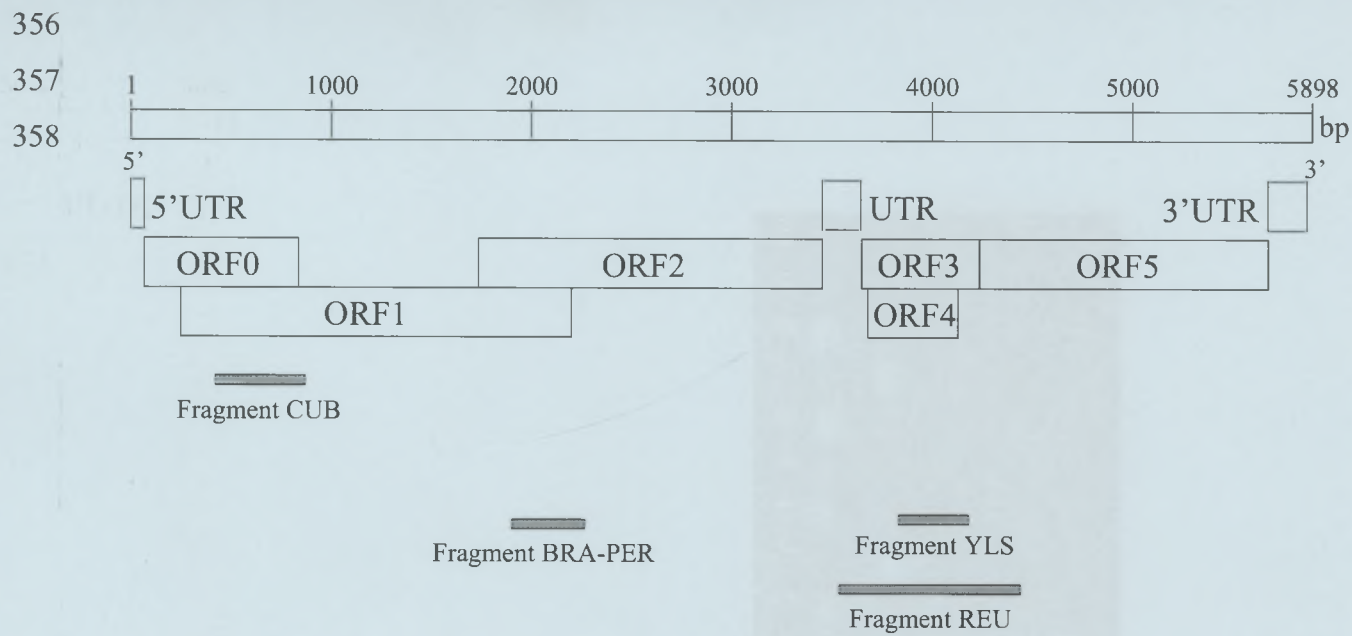


Figure 1 - Abu Ahmad - Plant Disease

359



Figure 2 – Abu Ahmad – Plant Disease

360

361

362 Figure captions

363

364 Figure 1. Genome organization of *Sugarcane yellow leaf virus* as described by Moonan et
365 al. (23) and location of the fragments amplified by RT-PCR. UTR = untranslated region,
366 ORF = open reading frame.

367

368 Figure 2. RT-PCR amplification products of three genotypes of *Sugarcane yellow leaf*
369 *virus* (SCYLV) with genotype specific primers. Lanes: 1 = ladder (1 kb); 2-9 = sugarcane
370 leaf samples infected by SCYLV isolates PER-YL1 from Peru, CUB-YL1 from Cuba,
371 REU-YL1 from Réunion, REU-YL2 from Réunion, BRA-YL1 from Brazil, COL-YL1
372 from Colombia, CHN-YL1 from China, REU-YL3 from Réunion, respectively; and 10 =
373 virus-free sugarcane leaf sample. Each virus isolate was a single genotype with the
374 exception of REU-YL3 that was a mixed infection (genotypes REU + BRA-PER).

375

CHAPITRE III

EVOLUTION DU *Sugarcane yellow leaf virus*
ET DESCRIPTION D'UNE NOUVELLE ESPECE VIRALE, LE
Sugarcane yellow leaf Cuba virus (SCYLCV)

Résumé

Les séquences nucléotidiques et protéiques des six ORFs des isolats COL-YL1a et COL-YL1b originaires de Colombie, et des isolats CUB-YL1a et CUB-YL1b originaires de Cuba, ont été comparées à celles de dix autres isolats du SCYLV représentant les génotypes BRA, PER et REU. Des différences supérieures à 20% ont été mises en évidence pour les ORFs 0, 1 et 5. En revanche, ces différences étaient inférieures à 10% pour les ORFs 2, 3 et 4. Ces résultats nous ont conduit à assigner les quatre isolats de Colombie et de Cuba à une nouvelle espèce virale qui, en attendant d'être validée par le comité international de taxonomie des virus (ICTV), a été nommée *Sugarcane yellow leaf Cuba virus* (SCYLCV).

En utilisant le test de recombinaison du programme RDP 2, au moins 22 événements de recombinaison ont été identifiés entre les séquences du génome des isolats du SCYLV/SCYLCV, ou au sein d'un même génotype, notamment pour les ORFs 1, 2 et 5 qui sont les régions les plus variables. En étudiant les variations du taux de substitutions non synonymes sur synonymes (ω) des séquences du SCYLV, une sélection positive sur certains acides aminés a été mise en évidence. Ce type de sélection agit sur les ORFs chevauchants 0, 1 et 2 et un ORF non chevauchant, l'ORF 5. Les plus fortes valeurs du taux ω ont été observées pour les ORFs 0 et 1, ω variant de 4 à 12, alors que ω a varié entre 2 et 3 pour les ORFs 2 et 5. Soixante sites sous sélection positive ont été détectés, et ces sites sont surtout localisés dans les régions chevauchantes ORF 0/ORF 1 et ORF 1/ORF 2. Certains sites sélectionnés positivement dans le premier ORF entraînent un changement d'acide aminé dans l'autre ORF, qui lui aussi est sélectionné positivement. Bien que les ORFs 3 et 4 soient entièrement chevauchants, ils ne sont pas soumis à une sélection positive.

Par ailleurs, les comparaisons des taux d'évolution des génotypes du SCYLV (r0 et r1) par Codeml implémenté dans PAML ont permis de montrer que l'ORF 1 du génotype PER évolue 5 fois plus vite que celui des deux autres génotypes. De même, les ORFs 2 et 5 du génotype BRA évoluent 2 et 1.5 fois plus vite que ceux des deux autres génotypes. L'ensemble de ces résultats pourrait être expliqué par l'adaptation du SCYLV à la canne à sucre, à différentes variétés de cette plante hôte, et en fonction de l'environnement.

1. INTRODUCTION

Les virus offrent à l'observateur un double visage : ils peuvent présenter de nombreuses et importantes variations et, *a contrario*, les maladies dont ils sont responsables peuvent se montrer stables sur de longues périodes. L'analyse de la variabilité phénotypique virale a longtemps été un thème majeur de l'étude des virus. La très grande diversité de la nature du support de l'information, son organisation, ainsi que les modes d'expression du génome ont été mis en évidence par le séquençage des génomes viraux (Astier *et al.*, 2001). Comme nous l'avons mentionné dans le deuxième chapitre, il y a production de variation à chaque génération virale, et les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas différents chez les virus de ceux qui agissent dans l'évolution de l'ensemble des organismes. Le génome des virus à ARN est répliqué sous l'action d'une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) d'origine virale. Cette enzyme est dépourvue de système de correction et introduit donc des erreurs (mutations, recombinaisons, réassortiments, et réarrangements de gènes) qui sont des mécanismes générant la variabilité des virus à ARN. La génération d'une telle diversité représente un avantage théorique pour les virus qui sont ainsi capables de s'adapter rapidement à de nouveaux environnements. Toutefois, ce processus est confronté à un certain nombre de contraintes évolutives qui conditionnent la diversité moléculaire des virus et l'émergence de nouveaux variants.

Lors de leur cycle infectieux, les phytovirus sont confrontés aux contraintes tissulaires, cellulaires et moléculaires imposées par leurs plantes hôtes. Ils peuvent également être confrontés à une alternance (facultative ou obligatoire) d'hôtes ou à des plantes résistantes. Dans ces conditions, la capacité d'adaptation des phytovirus à ARN à différentes plantes hôtes et à différents environnements cellulaires et tissulaires est déterminante pour le pouvoir pathogène de ces virus. L'analyse de la structure génétique et l'évolution des populations virales est un domaine important de la biologie (Garcial-Arenal *et al.*, 2003). La connaissance de leur évolution est aussi cruciale pour le développement de stratégies stables et efficaces de lutte, car l'échec de ces stratégies est souvent dû à l'évolution des populations virales. Le contournement des gènes de résistance par certains pathotypes en est l'exemple le plus frappant.

2. MECANISMES MODULANT LA VARIABILITE DES VIRUS

Les lois qui gouvernent l'évolution du SCYLV sont les mêmes que pour l'ensemble des virus à ARN, les rétrovirus et les pararétrovirus : au cours de leur réplication, une variation importante est générée. Elle donne naissance à des mutants, ou plus généralement

des variants, dont la fréquence dans la population change avec le temps : c'est le processus d'évolution.

2.1. La notion de quasi-espèce virale

La notion de quasi-espèce est importante pour comprendre l'évolution virale. Un virus doit avoir une stabilité et une identité dans le temps et dans l'espace, même s'il évolue et se montre capable de propriétés nouvelles. Ce sont ces deux aspects en apparence contradictoires de l'identité dynamique d'une population virale qui sont rassemblés dans le terme de quasi-espèce (Wilke *et al.*, 2005). Bien que le taux d'erreur soit assez constant et élevé pour tous les virus à ARN (Drake, 1993, Drake & Holland, 1999), la vitesse d'évolution peut être différente selon le virus, la souche virale et le gène considérés en raison des différentes pressions de sélection qui s'exercent (Astier *et al.*, 2001). Cette notion est basée sur un modèle mathématique, décrit et adapté par Eigen (1993 & 1996), qui représente l'organisation génétique d'une population virale issue d'un seul réplicon. À partir d'une séquence initiale représentée par un point dans l'espace des séquences, de nombreux mutants apparaissent continuellement à cause des erreurs de réplication au cours du cycle viral. Dans cet espace, la quasi-espèce forme un nuage de points centré sur la séquence d'origine. Le nuage n'a pas une forme régulière, et des points apparaissent et disparaissent sans cesse. Lorsque la fréquence d'erreur ne dépasse pas un seuil critique (environ une erreur par génome et par cycle de réplication), l'apparition de mutants est partiellement compensée par les mécanismes de sélection. Les mutants les mieux adaptés étant les plus fréquents, ils engendrent une nombreuse descendance ; il y donc un biais accélérant l'émergence de mutants de mieux en mieux adaptés. Ainsi, la sélection naturelle agit non seulement sur les génomes individuels, mais aussi sur la quasi-espèce dans son ensemble. Toute modification des contraintes appliquées au virus entraîne un déséquilibre dans la quasi-espèce qui peut conduire à une évolution du virus (Domingo *et al.*, 1998). La structuration des populations virales en quasi-espèces constituées d'individus hétérogènes permet ainsi d'expliquer l'extrême adaptabilité et la rapidité d'évolution des virus en fonction de facteurs sélectifs environnementaux (Roossinck, 1997).

La théorie de la quasi-espèce prédit également l'existence d'un seuil pour le taux de mutations au-delà duquel l'information génétique est perdue, conduisant à l'extinction de la population. Cette prédiction semble d'ailleurs confirmée par un certain nombre d'expériences dans lesquelles l'augmentation artificielle du taux de mutations chez certains virus conduit à

des pertes très importantes de leur infectivité, ce qui offre des perspectives thérapeutiques intéressantes (Domingo, 2000 ; Crotty *et al.*, 2001).

Étant donné que les virus à ARN sont caractérisés par la taille énorme des populations et des temps de génération courts, ils peuvent produire un nombre très élevé de mutants au cours d'une seule génération de l'organisme cellulaire qui l'héberge. Cette différence valide le concept de quasi-espèce virale (Domingo & Holland, 1997). Les virus à ARN et les rétroïdes (terme regroupant les rétrovirus et les pararétrovirus) ont un taux de mutation proche du seuil d'erreur « catastrophe » tel que défini par la théorie de la quasi-espèce ; chez les *Poliovirus*, le taux de mutation est de $2,1 \times 10^{-4}$, soit 1,5 mutations par génome et par cycle réplcatif ; il suffit d'augmenter ce taux à 2 mutations par génome pour baisser de 50% l'infectivité de ce virus et un taux de mutation de 9,7 par génome et par cycle réplcatif induit une réduction de 99% de son infectivité (Crotty *et al.*, 2001).

La structure génétique des espèces de *Luteoviridae* peut être considérée comme une quasi-espèce, comme cela a été montré pour les *Potyvirus* infectant la betterave (Hauser *et al.*, 2000). Au sein des espèces *Beet mild yellowing virus* (BMV) et *Beet western yellows virus* (BWV), des variants phénotypiques, sérologiques ou génomiques ont fréquemment été mis en évidence : variant du BWV-FL1 contournant un gène de résistance chez la laitue (Brault *et al.*, 2001), sérotypes particuliers de BWV infectant le colza (Rabenstein *et al.*, 1995), variants de BMV différant au niveau de la séquence des ORFs 0 et 3 et qui ne peuvent plus être identifiés par les méthodes moléculaires courantes (Brault *et al.* 2001).

Ces données semblent suggérer que, plutôt qu'un simple problème mécanique, une stratégie optimisant la capacité évolutive pourrait exister (Eigen, 1993, 1996 ; Domingo, 2000), bien qu'il n'existe pas de preuve directe d'une corrélation positive entre le taux de mutation et l'adaptation chez les virus à ARN (Furio *et al.*, 2005). De manière générale, la sélection favorise les variants les mieux adaptés (notion de *fitness* ou valeur adaptative) dans un environnement donné, mais la dérive génétique prend de l'importance dès lors que des phénomènes d'échantillonnage aléatoire apparaissent, en particulier lorsque la taille de la population est faible. Les effets de ces deux processus peuvent être difficilement distingués.

2.2. La sélection

Au sein d'une population, les pressions de sélection sont des forces directionnelles qui tendent à éliminer les variants les moins adaptés (sélection négative) ou à l'inverse, favoriser les variants les mieux adaptés (sélection positive, directionnelle ou diversificatrice). Un tel processus a donc pour conséquence une réduction de la diversité de la population dans un

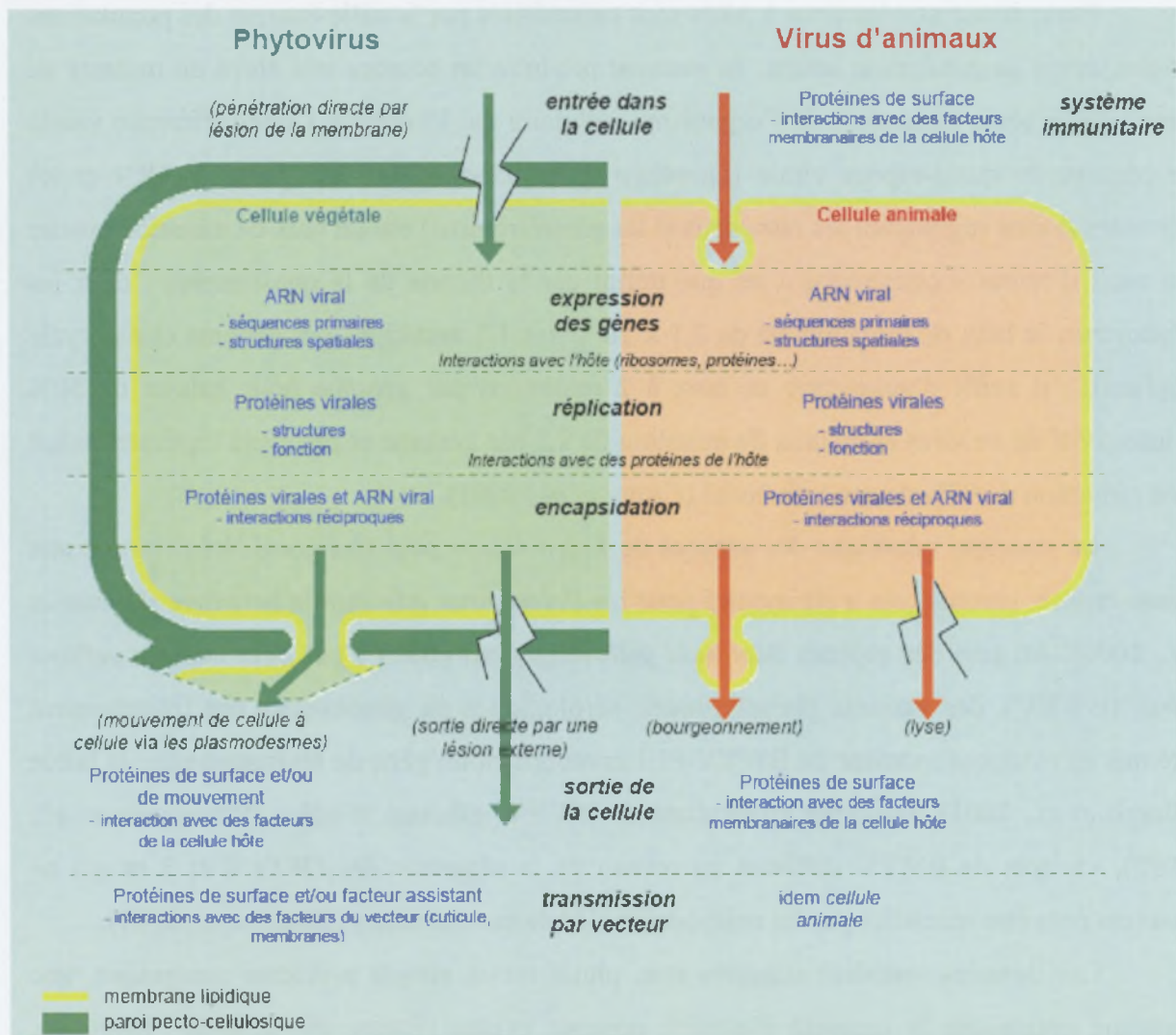


Figure 20 . Contraintes évolutives associées au cycle infectieux chez les phytovirus à ARN (à gauche) et chez les virus à ARN d'animaux (à droite). Les principales étapes du cycle d'infection sont détaillées (en noir), et les cibles de la sélection sont précisées à chaque étape (en bleu). Deux différences majeures distinguent les deux systèmes : 1) Les cellules végétales sont pourvues d'une paroi pecto-cellulosique qui conditionne les modalités d'entrée et de sortie des virus. 2) Pour les virus d'animaux, le vecteur est également un hôte à part entière dans lequel le virus se multiplie, alors que les phytovirus à ARN sont transportés "passivement" par leur vecteur sauf dans le cas des virus du genre *Tospovirus* (Reproduit d'après Guyader et Giblot-Ducray, 2004).

environnement donné et peut conduire à une augmentation de la divergence entre les populations lorsque les pressions de sélection sont différentes. Les composantes de l'environnement d'un virus à ARN, depuis l'environnement cellulaire en relation directe avec le virus jusqu'à l'environnement écologique dans lequel l'hôte et le vecteur vivent, constituent des facteurs de sélection. On peut remarquer plusieurs niveaux de sélection (Figure 20).

2.2.1. *Préservation de la fonctionnalité du génome (structure, expression et réplication)*

L'organisation du génome viral et les stratégies employées pour son expression constituent un premier niveau de sélection. Certaines structures secondaires ou tertiaires des ARN viraux ont un rôle fonctionnel crucial pour le bon déroulement du cycle viral. D'une manière générale, lors de la réplication, les structures secondaires en tige-boucle ainsi que les extensions polyadénylées (poly-A), présentes à l'extrémité 3' du génome de la majorité des virus à ARN positif, sont nécessaires à la synthèse du brin complémentaire. Par ailleurs, chez de nombreux virus à ARN et rétroïdes, l'expression d'ORFs chevauchants se fait par décalage du cadre de lecture par les ribosomes, un mécanisme qui nécessite une séquence « glissante » de 7 nucléotides suivie d'une structure en pseudo-nœud de l'ARN. Ces structures sont particulièrement sensibles aux mutations déstabilisant la conformation spatiale de l'ARN et constituent des motifs très conservés (Kim, 2000 ; Yi & Lemon, 2003), suggérant ainsi une sélection négative (purificatrice) intense. Toutefois, des mutations compensatoires apparaissent fréquemment et spontanément et celles-ci restaurent les structures de l'ARN et leur fonction (Luo *et al.*, 2003 ; Yi & Lemon, 2003), ce qui démontre en plus la rapidité d'adaptation chez les virus à ARN.

Le maintien des structures complexes de l'ARN viral est une nécessité qui est une des raisons invoquées pour expliquer la faible diversité au niveau des sites synonymes (positions dans un codon pour lesquelles le choix de plusieurs nucléotides est possible sans changer l'acide aminé) dans certaines séquences codantes ou au niveau des sites internes d'entrée des ribosomes (Simmonds et Smith, 1999). De plus, les régions partagées par des ORFs chevauchants constituent une contrainte pour l'évolution des virus à ARN qui emploient cette stratégie. Les conséquences de cette contrainte sont une faible diversité aux sites synonymes (Pavesi, 2000) et un biais dans l'utilisation des codons par rapport aux régions non chevauchantes pour augmenter la proportion des acides aminés ayant un niveau de dégénérescence plus important (Pavesi, 1997). Par ailleurs, les sites catalytiques de certaines

protéines enzymatiques codées par le génome des virus à ARN et des rétroïdes montrent que des pressions sélectives fortes imposant une grande conservation de leurs séquences. C'est le cas pour les ARN-polymérases ARN dépendantes chez lesquelles certains motifs de séquences et de structures tridimensionnelles sont très conservés chez les virus à ARN (positif et négatif) et les rétroïdes (Kamer, 1984).

2.2.2. La sélection par l'hôte

Ce niveau de sélection, correspondant aux interactions virus-hôte, peut expliquer pourquoi la plupart des virus à ARN ont une gamme d'hôte restreinte. Par exemple, des interactions sont nécessaires entre des facteurs de l'hôte (protéines, membranes cellulaires du réticulum endoplasmique ou du chloroplaste) et les ARN polymérases virales (Quadt, 1993), ce qui présente un caractère sélectif important, même si certains virus comme les bactériophages Q β peuvent contourner ce type de contrainte en évoluant vers une forme non dépendante du facteur codé par l'hôte (Schuppli, 2000).

Des différences importantes existent entre les virus pathogènes d'animaux et les phytovirus (Figure 20). En particulier, les cellules végétales sont entourées d'une paroi pecto-cellulosique rigide que les virions ne peuvent traverser et avec laquelle ils ne peuvent pas fusionner pour entrer dans la cellule. Il faut donc que les cellules soient lésées pour permettre l'entrée des virions dans l'hôte, et il faut l'intervention d'une protéine spécialisée (protéine de mouvement MP) pour le mouvement à courte distance (de cellule à cellule), alors que les virus pathogènes d'animaux peuvent se fixer directement aux membranes cellulaires de leur hôte. Il a été montré par des passages en série de virus tels que le *Vesicular stomatitis virus* (VSV), que l'alternance d'hôtes (insecte et vertébré) permet au virus d'optimiser sa réplication dans les deux hôtes sans pour autant l'obliger à un compromis (Novella *et al.*, 1999, Elena & Lenski, 2003). La nécessité de maintenir des stratégies de réplication différentes en fonction de l'hôte pourrait davantage expliquer la stabilité évolutive naturelle existante chez les arbovirus (virus transmis par arthropodes qui doivent se répliquer à la fois dans l'hôte vertébré et dans l'insecte vecteur). Les pressions de sélection peuvent s'expliquer de façon différentielle sur les protéines de surface des virus d'animaux.

Une autre différence majeure entre le monde animal et le monde végétal est l'existence chez les animaux d'un système de défense immunitaire sans équivalent chez les plantes. Même s'il n'existe pas de défense immunitaire, différents mécanismes de défense existent chez les végétaux pour s'opposer à l'infection virale. Pour les virus pathogènes d'animaux, la pression de sélection la plus importante est probablement le système

immunitaire, puisqu'il impose une dynamique importante au cours de l'infection : si le virus évolue pour y échapper, le système immunitaire évolue lui aussi pour contre-attaquer les nouveaux variants qui apparaissent, et c'est pour cette raison que les régions impliquées dans la reconnaissance virus/anticorps sont les plus variables (Guyader & GIBLOT-DUCRAY, 2004).

L'un des mécanismes les plus généraux chez les virus à ARN est l'extinction des gènes par PTGS («Post Transcriptional Gene Silencing»). Ce mécanisme peut toucher l'ARN viral et d'ailleurs, dans certaines infections, on peut observer un phénomène de « guérison » spontanée de la plante, dénommé « rétablissement ». Cependant, il semble qu'au cours de leur co-évolution avec la plante hôte, la majorité des virus à ARN ait adopté un mécanisme défensif : ils codent une protéine permettant la suppression du PTGS (Voinnet *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que chez trois espèces du genre *Polerovirus*, à savoir le *Beet mild yellowing virus* (BMV), le *Brassica yellowing virus* (BrYV) et le *Beet chlorosis virus* (BChV) infectant les Brassicacées, il existe une corrélation stricte entre la phylogénie basée sur la séquence de la protéine P0, suppresseur du PTGS, et le biotype déterminé par la gamme d'hôte (Hauser *et al.*, 2000), ce qui suggère bien une co-évolution entre le virus et des fonctions spécifiques de son hôte. Certains gènes de résistance chez les plantes fonctionnent comme des récepteurs qui reconnaissent des facteurs viraux pour déclencher une réaction de défense ; le facteur viral est un éliciteur ou facteur d'avirulence dans le concept de la relation gène pour gène (Flor, 1971). Le premier gène de résistance (dit de type R) qui a été décrit est le gène N du tabac qui confère la résistance au *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Whitham *et al.*, 1994). Malgré les contraintes structurales et fonctionnelles qui s'exercent sur les protéines virales de la capsid (CP), de mouvement (MP), de l'ARN polymérase ou encore la protéine P6, les gènes de résistance peuvent être contournés par l'émergence de variants virulents du virus par sélection positive : des mutations au niveau des gènes d'avirulence permettent au virus d'échapper à la reconnaissance du produit du gène de résistance.

D'autres interactions régissent la gamme d'hôtes des virus et leur pouvoir pathogène. Le mouvement de cellule à cellule et le mouvement systémique étant des étapes clés du cycle infectieux, les protéines de mouvement (MP) sont des cibles de la sélection par l'hôte. Ainsi, les mutations dans la séquence de la protéine MP permettent à certain virus, comme le *Brome mosaic virus* (BMV), d'infecter de nouveaux hôtes (Sasaki *et al.*, 2001).

La structure des populations du *Cucumber mosaic virus* (CMV) et du *Tobacco mosaic virus* (TMV) a été étudiée par Schneider & Roossink (2000), lors de passages en série sur un hôte commun (*Nicotiana benthamiana*), par séquençage du génome entier des deux virus. Une diversité a été générée au cours de ces passages successifs et celle-ci diffère pour les deux virus, suggérant qu'elle puisse être corrélée à l'amplitude de leur gamme d'hôte. Le

CMV, qui peut infecter un millier d'espèces différentes, accumule davantage de mutations que le TMV qui n'infecte qu'une centaine d'espèces. Ces résultats sont en faveur de l'existence de pressions d'évolution différentes selon le virus considéré. Enfin, il a été montré que pour un virus donné, des espèces d'hôtes différentes engendrent une diversité virale différente (Schneider & Roossink, 2001).

2.2.3. La sélection par le vecteur

Chez les phytovirus, il existe des effets de la sélection imposée par les vecteurs lors de la transmission, en particulier chez les *Potyvirus*. Ces virus sont transmis par des pucerons selon le mode non-circulant : les virions sont ingérés en quelques secondes sur une plante infectée, retenus dans les stylets de l'insecte, puis ré-inoculés en quelques secondes à nouveau (Hebrard *et al.*, 1999).

L'implication de la protéine de capsid (CP) et du facteur assistant HC-Pro des *Potyvirus* sont bien connus : le motif DAG (Asp-Ala-Gly) présent à la surface de la CP se lie au motif PTK (Pro-Thr-Lys) du facteur assistant HC-Pro dont les dimères interagissent par le motif KITC (Lys-Ile-Thr-Cys) avec la surface des stylets (Blanc *et al.*, 1997 ; Peng *et al.*, 1998). Il a été remarqué depuis longtemps que lorsque certains *Potyvirus* sont transmis mécaniquement au fil de nombreux cycles successifs au laboratoire, ils perdent spontanément leur transmissibilité par vecteur. Cette perte de transmissibilité a été attribuée à des mutations au niveau des motifs (DAG) conservés de la protéine de capsid (Atreya *et al.*, 1991), ou des motifs (PTK) et KITC dans la région HC-Pro (Huet *et al.*, 1994 ; Blanc *et al.*, 1998). Pendant les transmissions mécaniques, du fait de l'absence des pressions de sélection liées aux pucerons, il n'y a pas de contre sélection à l'égard des mutations au niveau des sites d'interaction CP/HC-Pro/cuticule des stylets. Des phénomènes similaires ont également été observés chez des virus à transmission non-circulante comme le CMV (Ng *et al.*, 2000) et le *Potato aucuba mosaic virus* (PAMV, *Potexvirus*), ainsi que chez le *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV, *Badnavirus*) et le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) (Blanc *et al.*, 2001 ; Froissart *et al.*, 2002), chez des virus à transmission circulante comme le BYDV (*Luteovirus*) (Lucio-Zavaleta, 2001 ; Dedryver *et al.*, 2005) et le PLRV (*Polerovirus*) (Van den Heuvel *et al.*, 1993), ou même chez des virus à transmission par champignons tel que le *Cucumber necrosis virus* (CNV) transmis par *Olpidium bornovanus* (Robbins *et al.*, 1997).

Il est donc évident que le vecteur exerce une pression sélective importante sur les motifs viraux impliqués dans la transmission. Il a aussi été démontré que des variants de *Tomato aspermy virus* (TAV) et *Cucumber mosaic virus* (CMV) fortement transmissibles

peuvent être positivement sélectionnés à partir de populations faiblement transmissibles et que les vecteurs peuvent échantillonner spécifiquement certains variants dans des mélanges (Perry *et al.*, 1992 ; van den Heuvel *et al.*, 1993).

2.3. La dérive génétique

Un faible nombre de particules virales peut fonder une nouvelle population après transmission et infection d'un nouvel hôte. Ces transferts de population de faibles effectifs constituent un goulet d'étranglement qui diminue le répertoire de l'information génétique transmise, et donc la diversité des populations (dérive génétique).

Les virus à ARN ainsi que les rétroïdes peuvent atteindre des tailles de population énormes, de l'ordre de 10^{12} virions dans leur hôte (Domingo & Holland, 1997), étant donné la combinaison de la faible taille du génome et d'un taux de réplication élevé (Moya *et al.*, 2000). Cependant, ce nombre est probablement loin de représenter la taille efficace de la population virale, qui correspond au nombre d'individus transmettant leurs gènes à la génération suivante, et qui constitue un paramètre important dans l'évolution des populations virales (Garcia-Arenal *et al.*, 2001 et 2003).

Etant donné le taux de mutation très élevé et la forte proportion de mutations délétères (Elena et Moya, 1999), de nombreux variants sont incapables de se répliquer. Cela explique en partie la faible infectivité (proportion de particules virales effectivement capable d'induire une infection parmi l'ensemble des particules d'un inoculum) des populations virales, et réduit donc potentiellement la taille efficace des populations. Ainsi, dans le cas du *Human immunodeficiency virus*-type 1 (HIV-1), cette taille efficace a été estimée à 10^3 - 10^5 pour plus de 10^8 cellules infectées (Leigh-Brown, 1997). Pour les phytovirus tel que le *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), une valeur comparable de population efficace de 10^5 virions a été estimée pour une population virale totale de 10^{14} virions (Moya *et al.*, 1993). A la proportion de particules virales effectivement capables d'induire une infection, viennent s'ajouter d'autres facteurs qui peuvent encore baisser la taille de la population efficace. Parmi ces facteurs, deux semblent être les plus importants pour les virus de plantes : le mouvement systémique du virus au sein de son hôte et la transmission par puceron.

Le mouvement systémique des phytovirus au sein de leur hôte donne lieu à des goulets d'étranglement (Sacristán *et al.*, 2003). Ainsi, chez le tabac, la taille efficace de population du TMV au cours de l'infection systémique est de quelques particules, alors qu'environ 500 particules virales induisent l'infection systémique sur la feuille inoculée (Sacristán *et al.*, 2003). De tels goulets d'étranglement lors du développement de l'infection

dans l'hôte sont probablement aussi en partie responsables des différences de diversité génétique observées lors de l'inoculation de différentes espèces végétales par le CMV ou le TMV (Schneider & Roossinck, 2001 ; Li & Roossinck, 2004) ainsi que le *Plum pox virus* (PPV) (Jridi *et al.*, 2006). Cependant, dans le cas du CaMV, la taille de la population *in planta* semble suffisamment grande pour ne pas observer d'effet de dérive génétique lors de la colonisation systémique de la plante et dans les conditions expérimentales testées (Blanc & Monsion, résultats non publiés).

Hall *et al.* (2001) ont observé que la transmission par pucerons à partir de plantes co-infectées par deux souches de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) résultait souvent en des cultures pures de l'une ou l'autre des deux souches, bien qu'elles aient toutes deux la même capacité à être transmises. La transmission par vecteurs peut ainsi favoriser la dérive génétique, les gènes des individus non transmis étant perdus même s'ils confèrent des caractères bénéfiques non liés à la transmission. Une hypothèse a été émise par Pirone & Blanc (1996) selon laquelle la transmission assistée par facteur assistant (*Potyvirus* avec la protéine HC-Pro ou *Caulimovirus* avec la protéine P2) aurait été sélectionnée au cours de l'évolution car elle permet de contrer la dérive génétique (stratégie assistant « Helper »). En effet, la diminution ou la perte de la transmissibilité, pour des génomes codant un facteur assistant déficient, peut facilement être complétée en utilisant le facteur assistant produit par d'autres génomes de la même population. Ainsi, l'échantillon de la population transmis conserve une plus grande hétérogénéité génétique (Hebrard *et al.*, 2001). En revanche, dans le cas des virus transmis sans l'intermédiaire du facteur assistant (stratégie capsid), une déficience au niveau de la protéine de capsid pourra plus difficilement être complétée (par transcapsidation) et la population transmise sera plus homogène génétiquement (Pirone & Blanc, 1996 ; Guyader & Giblot-Ducray, 2004). Ces phénomènes pourraient prendre une importance particulière lors de l'adaptation des virus à de nouveaux vecteurs. Il semble donc que les populations virales soient soumises aux effets aléatoires dus à la dérive génétique, à la fois lors de la transmission inter-hôtes (le plus souvent par vecteurs) et au cours de la colonisation intra-hôte. Les effets fondateurs correspondent à la fluctuation importante des fréquences alléliques dans une nouvelle population créée par la migration d'un petit nombre d'individus à partir d'une population mère. Le plus souvent, il y a réduction de la diversité génétique dans la population fille par rapport à la population mère. La modification de fréquence est due au tirage aléatoire des migrants (et donc de leurs allèles) dans la population mère. Les effets fondateurs sont expliqués par la dérive génétique, et sont responsables de la subdivision géographique des populations du *Tobacco mild green mosaic virus* TMGMV

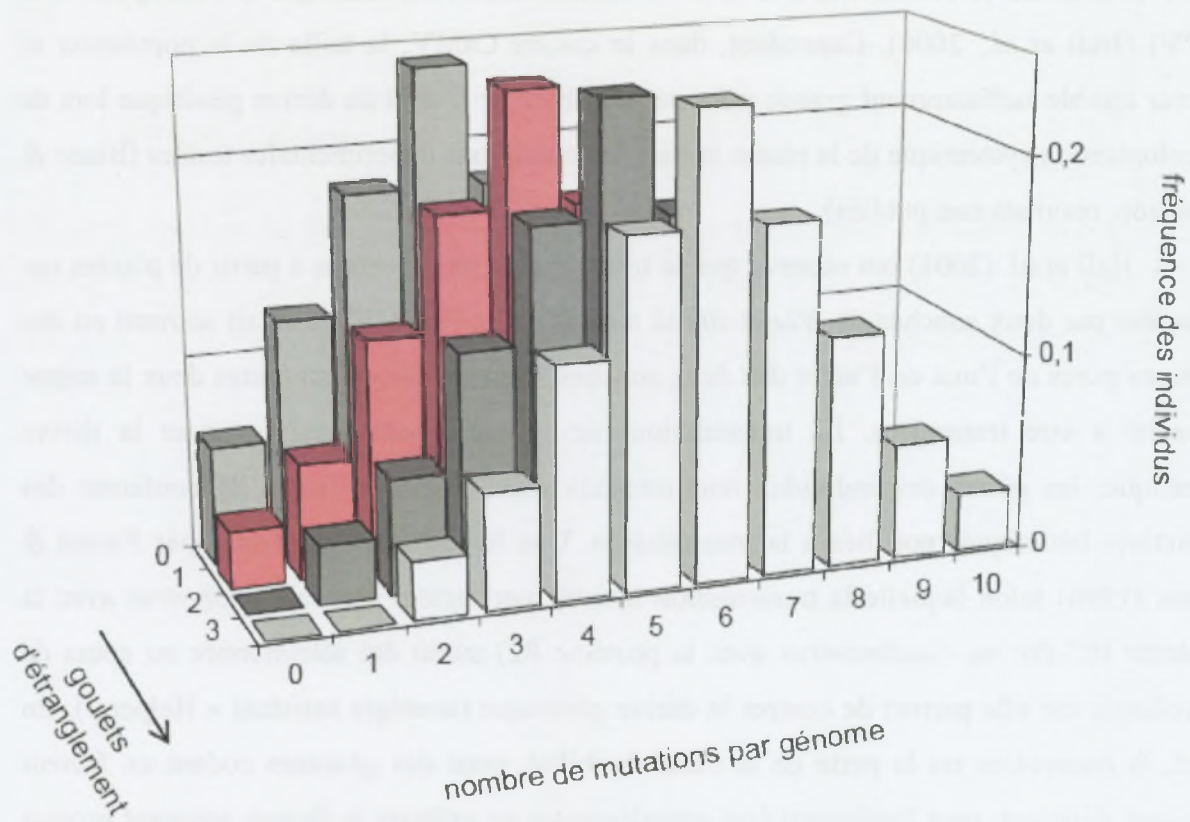


Figure 21 . Distribution des mutations dans les génomes d'une population soumise à une dérive génétique. A chaque passage par un goulet d'étranglement (du fond vers le premier plan), les classes d'individus les moins mutés (0 ou 1 mutation par génome) sont progressivement perdues et la distribution du nombre de mutations se décale vers la droite (accumulation de mutations). Le « cliquet de Muller » a tourné d'un cran à chaque passage (Reproduit d'après Guyader et Giblot-Ducray, 2004).

(Fraile *et al.*, 1997) et de la faible diversité du *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) après son introduction en Martinique (Desbiez *et al.*, 1996).

L'impact de goulets d'étranglement répétés sur l'évolution des populations de virus à ARN, et plus particulièrement sur leur valeur adaptative moyenne, a été le sujet de travaux chez les virus lytiques (Escarmis *et al.*, 1996), le HIV-1 (Yuste *et al.*, 1999) et les bactériophages (Chao, 1990 ; de la Peña *et al.*, 2000). Ces travaux ont permis de montrer un phénomène général : les réductions répétées et drastiques de la taille des populations virales entraînent une dérive génétique forte qui conduit inévitablement à l'accumulation de mutations délétères. Ce processus appelé « cliquet de Muller » (Haigh, 1978), est expliqué par le fait que, pour les populations asexuées de faible effectif dont le taux de mutation est élevé, les individus ne présentant aucune mutation deviennent rares et tendent à être irréversiblement perdus par dérive génétique (Figure 21).

2.4. Apports de la génétique des populations à l'évolution

L'évolution des virus à ARN peut être conceptualisée comme un changement dans les propriétés génétiques des populations. Le but même de la génétique des populations est l'étude des variables (phénomènes) responsables des changements de fréquence des allèles dans une population (Moya *et al.*, 2000). Le concept de quasi-espèce (et la théorie associée) a été spécifiquement adapté en virologie pour prendre en compte le taux d'erreurs particulièrement élevé lors de la réplication de ces virus (Eigen, 1996).

Actuellement, le débat reste ouvert entre les défenseurs de la notion de la quasi-espèce (Domingo, 2002) et les généticiens des populations pour qui les différents modèles classiques de génétique des populations virales suffisent à décrire des populations virales évoluant aussi rapidement que les virus à ARN (Holmes & Moya, 2002). Très récemment, une analyse très argumentée a permis de conclure que les deux théories sont concordantes et aisément réconciliables (Wilke, 2005), ce qui semblerait devoir mettre un terme à ce débat vieux de près de 10 ans. En tout état de cause, la biologie évolutive des virus a fait l'objet de très nombreuses études au cours des deux dernières décennies, et des prédictions théoriques de la génétique des populations et /ou de la théorie de la quasi-espèce ont été validées.

Plusieurs études d'évolution expérimentale portant sur le VSV, le *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) et le phage $\phi 6$ ont permis d'étudier l'impact de la taille efficace des populations sur l'évolution de valeur adaptative et la distribution de l'effet des mutations délétères (Chao, 1990 ; Novella *et al.*, 1995a, et 1995b ; Burch & Chao ; 1999; Elena & Moya, 1999 ; Sanjuán *et al.*, 2004b). Il a été montré que, contrairement au transfert des populations de faible effectif (constituant des goulets d'étranglement) (Figure 21) qui

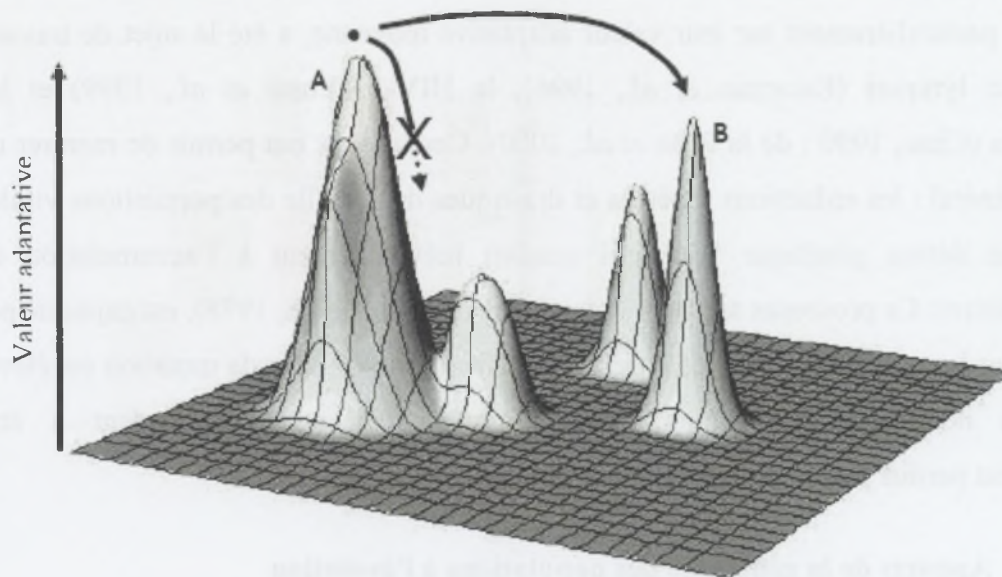


Figure 22 : Paysage adaptatif hypothétique (développé par Guyader, 2003) pour un *Polerovirus* (PLRV) en conditions naturelles. Le plan correspond à la projection d'un espace de séquences avec 4^N dimensions (pour un génome de taille N) où les génotypes immédiatement voisins diffèrent entre eux par une mutation. Une population virale (•) occupant le pic A peut se déplacer sur le pic B lors d'événements évolutifs majeurs (délétion, recombinaison...), alors que la majorité des mutations ponctuelles conduisent graduellement la population vers la vallée entourant le pic A où les variants sont éliminés par sélection naturelle (X).

entraînent une diminution de la valeur adaptative par le phénomène du cliquet de Muller, les transferts de populations de taille importante permettent des gains de valeur adaptative très importants, et ce même lorsque les virus sont déjà bien adaptés à un milieu cellulaire (Clark *et al.*, 1994). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la probabilité d'apparition de mutations bénéfiques ou compensatoires est plus grande au sein de populations de grande taille permettant l'action de la sélection naturelle ; les gains enregistrés sont d'autant plus importants que la compétition entre variants générés au cours de l'adaptation est importante et a un effet positif sur la valeur adaptative de chacun des génotypes compétiteurs, selon le processus de la « reine rouge » (Clarke *et al.*, 1994 ; Solé *et al.*, 1999).

Le concept de la « reine rouge » a initialement été proposé par van Valen en 1973 pour décrire la compétition entre deux espèces, et ce concept illustre un combat « à somme nulle » qui correspond à un équilibre dynamique : lorsque l'un des compétiteurs augmente son efficacité (sa valeur adaptative), l'autre en fait de même pour se maintenir au même niveau. En accord avec ce principe, les travaux de Clark *et al.* (1994) sur un virus à ARN ont permis de montrer qu'à l'issue de la compétition, non seulement le gagnant, mais aussi le perdant, ont vu leur valeur adaptative augmenter. Alors que le principe d'exclusion compétitive implique que l'équilibre soit rompu en faveur de l'un des compétiteurs, un autre modèle prévoit la coexistence possible de deux populations, même si celles-ci luttent pour l'utilisation des mêmes ressources. Ce modèle, appelé sélection fréquence-dépendante, est un mécanisme selon lequel la valeur adaptative d'un génotype varie en fonction de sa fréquence dans la population. Ce type de relation semble permettre à un variant du VSV de se maintenir de manière stable, même lorsqu'il a une faible fréquence par rapport à un compétiteur ayant la même valeur adaptative (Elena *et al.*, 1997).

Certains problèmes en évolution et génétique des populations (notamment les concepts mentionnés ci-dessus) sont étudiés dans un cadre basé sur le « paysage adaptatif » (Figure 22). Dans ce cadre, l'évolution est interprétée comme le mouvement des populations vers le sommet des pics de haute valeur adaptative, sous l'influence des mutations et de la sélection. Ce mouvement vers le haut est considéré comme une optimisation qui conduit à un équilibre fixe.

Mis-à-part les deux forces majeures de l'évolution (pression de sélection et dérive génétique), il a récemment été démontré qu'un troisième phénomène important doit être pris en compte pour la compréhension de l'évolution des virus. Il s'agit de la complémentarité qui est, par définition, l'interaction entre les produits des gènes viraux durant une coinfection, qui induit une augmentation ou une diminution dans la production de descendances des virus

Encadré 1

Estimateurs du maximum de vraisemblance (LRTs)

Selon la méthode probabiliste, il est possible de calculer la vraisemblance L de données X (séquences nucléotidiques ou protéiques) à partir d'une topologie inférée de l'arbre phylogénétique et d'un modèle d'évolution des séquences réglé par un ensemble de paramètres θ . La fonction de vraisemblance $L(\theta;X)=f(\theta/X)$ est la probabilité d'observer les données connaissant l'arbre, c'est-à-dire connaissant la topologie et les paramètres du modèle. La meilleure estimation des paramètres θ s'obtient en maximisant la fonction de vraisemblance $L(\theta;X)$ ou son logarithme $\ln(L(\theta;X))=l(\theta;X)$.

Tests de rapports de vraisemblance (LRT)

Soit M_1 un modèle général (hypothèse alternative, p_1 paramètres) et M_0 un modèle particulier de M_1 (hypothèse nulle, p_0 paramètres, $p_1 > p_0$). Comparer ces deux modèles emboîtés revient à calculer les logarithmes de leurs vraisemblances l_0 et l_1 , et à utiliser la statistique $2\Delta l = 2(l_1 - l_0)$ qui suit asymptotiquement une loi du Chi2 à $(p_1 - p_0)$ degrés de liberté si M_0 est vrai. $2\Delta l$ peut être comparé à un χ^2 de même paramètre pour tester le rejet de M_0 devant M_1 .

parentaux (Mahy, 2001). Dans les virus à ARN multipartites, les mutations délétères sont purgées moins rapidement lors de co-infections où la complémentation peut agir. En conséquence, la complémentation paraît représenter une force qui affaiblit la sélection contre les mutations délétères (Froissart *et al.*, 2004).

2.5. Objectif de l'étude

La synthèse bibliographique ci-dessus nous a permis de montrer que plusieurs mécanismes peuvent moduler la variabilité d'un virus. Ces mécanismes sont encore inconnus chez le SCYLV qui est cependant un virus variable comme cela a été mis en évidence dans le deuxième chapitre de cette thèse. En effet, quatre génotypes ont été identifiés (BRA, CUB, PER et REU) dont le génotype CUB qui est un génotype très particulier et qui n'existe qu'au Brésil, en Colombie, à Cuba et en Guadeloupe. Le pourcentage d'identité entre ce génotype et les autres est d'environ 80% pour un fragment partiel des ORFs 0 et 1, et d'environ 90% pour un autre fragment partiel des ORFs 1 et 2. Ce résultat nous a conduit à émettre l'hypothèse que ce génotype correspond à une autre espèce virale capable de produire des symptômes de jaunissement sur la canne à sucre. En effet, selon la définition donnée aux espèces virales appartenant aux *Luteoviridae*, deux isolats viraux appartiennent à deux espèces virales différentes lorsque leurs séquences en acides aminés d'un ORF différent de plus de 10%. Le but de notre étude était donc de vérifier cette hypothèse en comparant les séquences complètes des six ORFs du génome de quatre isolats représentant le génotype CUB (COL-YL1a et COL-YL1b originaires de Colombie et CUB-YL1a et CUB-YL1b originaires de Cuba) avec celle du génome de dix autres isolats viraux dont l'isolat de référence (SCYLV-A originaire de Floride).

Par ailleurs, étant donné que le SCYLV est l'agent causal d'une maladie émergente, nous avons étudié les éventuels événements évolutifs et de sélection qui pourraient exister au sein du génome du SCYLV. Dans ce but, nous avons analysé les séquences codantes du génome du SCYLV en nous intéressant au profil des substitutions synonymes et non synonymes qui reflète les effets de la sélection au niveau protéique, et en comparant ce profil pour les six ORFs de différents isolats du SCYLV. Les modèles implémentés dans le paquetage de logiciels PAML (Yang, 1997 ; Yang *et al.*, 2000) ont été utilisés. Ceux-ci permettent d'étudier la distribution des sites synonymes (S) et non synonymes (NS) et le ratio ($\omega = d_n/d_s$) des séquences (Encadrés 1 et 2).

Encadré 2 :

Ks : Proportion de substitutions synonymes (silencieuses) par site.

Ka : Proportion de substitutions non synonymes (entraînant un remplacement d'acide aminé) par site.

Ka/Ks<1 : Sélection purificatrice : Certaines substitutions non synonymes sont contre sélectionnées. Le taux de substitutions non synonymes est donc inférieur au taux de substitutions synonymes

Ka/Ks=1 : Evolution neutre : aucune contrainte sélective ne joue sur les substitutions non synonymes. Leur taux est égal à celui des substitutions synonymes

Ka/Ks>1 : Sélection positive : des substitutions non synonymes conférant un avantage sélectif sont conservées par la sélection naturelle. Le taux de substitutions non synonymes est donc supérieur au taux de substitutions synonymes.

Enfin, étant donné que le SCYLV est un virus issu des recombinaisons entre trois genres de *Luteoviridae*, nous avons également analysé les événements de recombinaisons possibles entre ces différents génotypes au cours de l'évolution du SCYLV.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés ci-après sous la forme d'un article qui sera soumis à la revue *Molecular Biology and Evolution*.

2.6. Révélation d'une nouvelle espèce virale par l'analyse phylogénétique du *Sugarcane yellow leaf virus* et description d'événements évolutifs

Article 3

Youssef Abu Ahmad, Philippe Gayral, Benoît Moury, Philippe Rott and Monique Royer. 2006. Sequence analysis of *Sugarcane yellow leaf virus* isolates reveals evidence for a new virus species and evolutionary events. *Molecular Biology and Evolution* (A soumettre).

Running title: Evolution of SCYLV

Sequence analysis of *Sugarcane yellow leaf virus* isolates reveals evidence for a new virus species and evolutionary events

Youssef Abu Ahmad*, Philippe Gayral*, Benoît Moury[†], Philippe Rott* and Monique Royer*

*Cirad, UMR Agro.M-Cirad-Inra Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI), Montpellier Cedex 5, F-34398 France ; [†] Station de Pathologie Végétale, Institut National de la Recherche Agronomique, F-84143 Montfavet cedex, France

Corresponding author: Monique Royer, Cirad, UMR Agro.M-Cirad-Inra BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Phone: 33 4 99 62 48 44

Fax: 33 4 99 62 48 08

E-mail: monique.royer@cirad.fr

Abstract

Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) is a variable virus that is largely distributed in all sugarcane growing locations in the world. Up to date, four SCYLV genotypes have been described (BRA, CUB, PER and REU). In order to further investigate the genetic diversity of SCYLV, four new genome sequences of isolates collected in Cuba and Colombia were compared with 10 genome sequences and 198 partial sequences from 89 SCYLV isolates available in Genbank. Phylogenetic analyses revealed a new virus species formed by isolates from Colombia and Cuba belonging to genotype CUB, and the name Sugarcane yellow leaf Cuba virus (SCYLCV) was thus proposed as a putative new virus species. Maximum-likelihood based algorithms were used to analyze sequence data and to determine the selective forces exerted on the six ORFs of the SCYLV genome. The ratio between nonsynonymous and synonymous substitutions (ω) was used to detect positive selection at particular codon sites. Amino acid sequences were conserved in ORFs 3 and 4 and no positive selection was detected in these two ORFs. In contrast, 60 positively selected codon sites were identified in ORFs 0, 1, 2 and 5 ($\omega > 1$), especially in the overlapping regions. At least 22 events of recombination were also detected

between SCYLV genotypes using the RDP package. Comparison of the evolution rates between SCYLV branches of the phylogenetic trees demonstrated large differences in evolution speed. ORF 1 evolved five times more rapidly in genotype PER than in the other genotypes. On the other hand, ORFs 2 and 5 evolved two times faster in genotype BRA than in the other genotypes. Therefore, positive selection and genomic evolutionary events (recombinations, unusual indels, unusual frameshift sites and truncated ORFs) appear very important in the differentiation of the SCYLV genome within the *Luteoviridae* family.

Key words: New virus species, *Polerovirus*, positive selection, Sugarcane yellow leaf Cuba virus, *Sugarcane yellow leaf virus*.

Introduction

Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) is the causal agent of yellow leaf of sugarcane (Rott et al. 2005), a disease that is widespread in most sugarcane-producing countries (Lockhart and Cronjé, 2000). The most prominent symptom of the disease is a yellowing of the abaxial surface of the leaf. This yellowing progressively spreads throughout the leaf tissue and is followed by necrosis from the tip to the base of the leaf (Vega et al. 1997; Comstock et al. 1998). Virions are found in symptomatic and asymptomatic plants (Scagliusi and Lockhart 2000; Rassaby et al. 2003), and SCYLV is transmitted by aphids (*Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* and *R. rufiabdominalis*) from infected to healthy plants in a persistent non multiplicative manner (Scagliusi and Lockhart 2000; Schenck and Lehrer 2000).

The complete genome of SCYLV has been sequenced and characterized (Moonan et al. 2000; Smith et al. 2000). It consists of a single positive-sense ssRNA of about 5895-5898 nucleotides and encodes at least six major open reading frames (ORFs 0–5). The genetic information of SCYLV is densely packed as 25% of the genome consists of overlapping coding regions. As a consequence, several strategies are necessary to allow protein expression from all ORFs, from the production of subgenomic RNAs through frameshift and termination suppression. ORF 0 encodes for a 30.2 kDa-suppressor of posttranscriptional gene silencing or PTGS (Mangwende et al. 2005) but it may also be involved in symptom expression (van der Wilk et al. 1997) and in host range specificity (Veidt et al. 1988; Mayo et al. 1989). The other ORFs encode a multifunctional protein (ORF 1, 72.5 kDa), the RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp) (ORF 2, 64.4 kDa), the capsid protein (ORF 3, 21.8 kDa), the p17 movement protein (ORF 4, 16.6 kDa), and the read-through protein associated with virus transmission by aphids (ORF 5, 52.1 kDa) (Smith et al. 2000). ORFs 1 and 2 are translated together and the

peptide sequence encoded by ORF1 includes sequence motifs of both a serine proteinase and a putative genome-linked viral protein (VPg). The protein encoded by ORF 5 is produced via a translational read-through of the peptide encoded by ORF 3 and might be linked to transmission (Ziegler-Graff et al. 1996; Brault et al. 2003).

SCYLV is considered an emerging virus that has evolved by recombination between ancestors of the three genera (*Luteovirus*, *Polerovirus*, and *Enamovirus*) forming the family *Luteoviridae* (Moonan et al. 2000; Smith et al. 2000). SCYLV has a luteovirus-like capsid and a polerovirus-like polymerase sequence (Moonan et al. 2000). Because 54% of the SCYLV amino acid sequence (ORFs 1 and 2) is similar to *Polerovirus*, it has recently been assigned to the genus *Polerovirus* (D'Arcy and Domier. 2005). Several genetic diversity studies showed that SCYLV is a variable virus (Borg et al. 2001; Moonan and Mirkov, 2002; Abu Ahmad et al., 2006a). Recently, Abu-Ahmad and co-workers (2006a and 2006b) described the occurrence and geographical distribution of four SCYLV phylogenetic groups designated as genotypes BRA, CUB, PER and REU for Brazil, Cuba, Peru and Réunion Island respectively. These phylogenetic analyses were performed with sequences of 73 isolates from various sugarcane growing countries. Genotypes BRA and PER are, however, phylogenetically relatively close and could not be differentiated by specific RT-PCR primers so far (Abu Ahmad et al. 2006b). Therefore, these two genotypes were combined and called genotype BRA-PER. Only a single genotype of SCYLV was found in most sugarcane production areas, and genotype BRA-PER was the most widespread in a survey that included 18 geographical locations worldwide. In contrast, genotypes CUB and REU were found in only 4 of 18 geographical locations (Abu Ahmad et al. 2006b). Phylogenetic analyses with two RT-PCR fragments of SCYLV from ORFs 0 and 1 and from ORFs 1 and 2 showed that SCYLV isolate CUB-YL1 (genotype CUB) represented a distinct lineage distant from all the other isolates (Abu Ahmad et al. 2006a). Low nucleotide sequence identity (80-90%) of isolate CUB-YL1 with the other isolates suggested that CUB-YL1 was a particular genotype, and may be even another virus species causing yellow leaf of sugarcane. Additionally, recent studies showed that genotypes BRA-PER, CUB and REU are three different strains of SCYLV based on transmission efficiency and capacity to infect specific sugarcane cultivars (Abu Ahmad *et al.*, unpublished data).

In this study, comparison of entire translated genome sequences of SCYLV allowed us to demonstrate that SCYLV is caused by two different virus species, namely SCYLV and an other species that was tentatively named Sugarcane yellow leaf Cuba virus (SCYLCV). We also report here large-scale molecular variability and sequence diversity of SCYLV isolates that most likely recombined during evolution of SCYLV. Additionally, nonsynonymous/synonymous

substitution rates (ω) suggested that strong selective pressures exerted on several ORFs of SCYLV.

Materials and Methods

Leaf samples and total RNA extraction

Two sugarcane plants infected by SCYLV were collected from the sugarcane quarantine of CIRAD in Montpellier, France (Chatenet et al. 2001). One originated from Colombia (cv. CC87-505) and the other from Cuba (cv. C132-81) (table 1). Leaves of each plant were stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted and purified from sugarcane leaves (100 mg of lamina and midrib) with the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total RNA was eluted in a final volume of 40 µl of diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water and stored at -20°C. Two RNA extractions were done with different leaf samples of each plant. Virus isolates obtained from the same plant were differentiated, at the end of their name, by the letters a and b, respectively.

Detection of SCYLV and genotype identification in leaf samples

The single-tube RT-PCR protocol (ready-to-go RT-PCR beads, Amersham) was used to detect the presence of SCYLV in leaf samples as described by Abu Ahmad et al (2006a). SCYLV genotypes were determined as described by Abu Ahmad et al (2006b).

Production of SCYLV amplicons by RT-PCR

Attempts to amplify the complete sequence of the 6 ORFs of SCYLV isolates COL-YL1a, COL-YL1b, CUB-YL1a, and CUB-YL1b, were done using the Titan One Tube RT-PCR System kit (Roche) and 6 primer pairs located along the genome. These primer pairs were designed to amplified fragments Y1, A, B, Y4, D and Y6 (fig. 1) and were previously described (Abu Ahmad et al. 2006a). It should be noted that the titan system uses a mixture of proofreading polymerases. The same RNA template was used for all RT-PCR reactions. The 25 µl RT-PCR mix consisted of 5 µl RT-PCR buffer (5x), 1.25 µl DTT solution (100 mM), 0.25 µl RNase inhibitor (40 U µl⁻¹), 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 µl Titan enzyme mix, 0.05 µl of each primer pair (100 µM), 1 µl of eluted RNA and DEPC water to final volume. The RT-PCR program was identical for amplification of all six genome fragments (fig. 1), and as follows: 54°C for 60 min,

94°C for 2 min, 35 cycles of 94°C for 15 s, 61°C for 2 min and 68°C for 2 min, and a final 68°C extension step for 10 min.

Because amplification of fragment Y1 failed several times using above described protocol and with three different primers pairs (data not shown), an approximately 300 bp cDNA sequence of the 5' end of the genome (fragment R, fig. 1) was amplified using the 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche Diagnostics) and primers Race 1 (CTATAGAAGGACAGACTTGA), Race 2 (GTTGTGTCTGGCAGGAGGAG) and Race 3 (CCATTGTAGTAACAACAGCGC) following the manufacturer's protocol.

Cloning and sequencing

RT-PCR products were cloned with the TOPO TA Cloning® kit for sequencing (Invitrogen) using the manufacturers' protocols. Competent *Escherichia coli* DH5α cells were transformed with the recombinant plasmids and plasmid DNA was then extracted using the Wizard® kit (Promega). Inserts were sequenced by Genome Express (Grenoble, France) using the Applied Biosystems 3700 sequencer and the BigDye Terminators premix according to Applied Biosystems protocol. The sequencing primers were pUC/M13 Forward and pUC/M13 Reverse. Internal primers of fragments A and Y4 were designed and used to sequence the entire RT-PCR fragment. One clone per amplicon was sequenced and used for sequence alignment and phylogenetic analyses. Previous data showed that sequencing several clones yield very close if not identical sequences (Abu Ahmad et al 2006). The GenBank accession numbers of the sequences determined here and used for phylogenetic analyses are listed in table 1.

Tests of recombination events

Test of recombination events were performed with the entire translated sequence (ORFs 0-5) of the 14 SCYLV isolates cited in table 1 and RT-PCR fragments A, B, and D of all available isolates (fig. 1).

Analyses for detection of potential recombinant sequences, identification of likely parental sequences and localization of possible recombination breakpoints in multiple sequence alignments were done with the Recombination Detection Program RDP (Martin and Rybiki, 2000). GENECONV (Padidam et al. 1999), RECSCAN (Martin et al. 2005a), MAXIMUM χ^2 (Smith, 1992), and CHIMAERA (Martin et al. 2005a), SISTER SCAN (Gibbs et al. 2000) methods were applied as implemented in RDP-V2 (Martin et al. 2005b). Analyses were

performed with default settings, with the exception of linear sequence setting and 1,000 bootstrap re-sampling setting. A *P*-value of 0.05 was used to determine recombination events with each detection method. Only recombination events detected by at least two different methods were taken into consideration.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed with the sequences obtained here and additional sequences of the complete translated genome of 10 SCYLV isolates obtained from GenBank (table 1). Sequences were aligned and analyzed with DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Canada: version 5.2.9).

Sequences obtained for the six fragments (R or Y1, A, B, Y4, D and Y6) were aligned and sequences upstream ORF 0 ATG and downstream ORF 5 stop codon were removed. A contiguous 5606-5609 bp (ORFs 0-5) sequence was then obtained for COL-YL1a, COL-YL1b, CUB-YL1a, and CUB-YL1b isolates. Similar contiguous 5612 bp (ORFs 0-5) sequences corresponding to the entire translated genome sequence were obtained from GenBank for the following ten SCYLV isolates: BRA-YL1a, BRA-YL1b, CHN-YL1, PER-YL1a, PER-YL1b, REU-YL1a, REU-YL1b, REU-YL2, SCYLV-A and SCYLV-IND (table 1). These 14 contiguous ORFs 0-5 sequences were used for phylogenetic analysis. Additional SCYLV-F complete genome sequence (accession number AJ249447) available in GenBank was not used because it contained too many degenerated alphabet letters that represent an artifact for phylogenetic analyses (152 out of 5895 bp). Jukes-Cantor's model was used to correct distances for multiple substitutions, and the phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method. Robustness of nodes of the phylogenetic tree was assessed from 1,000 bootstrap re-samplings and bootstrap values were used as labels for internal nodes of the complete tree. A 98% sequence identity limit and position in the phylogenetic tree were used to assign the virus isolates to different clusters. Amino acid sequences of the six ORFs (ORFs 0 - 5) of all isolates were deduced from DNA sequences of contiguous fragments (ORFs 0-5), and were aligned to determine percentage of amino acid sequence similarity. Nucleotide sequence identities were obtained from the identity matrix of sequences of the six ORFs deduced from DNA sequences of contiguous fragments (ORFs 0-5).

Estimation of the selective pressures on proteins of SCYLV

Analyses of the selective pressures on SCYLV proteins were performed with partial ORFs encoded by fragments Y1, R, A, B, C, Y4, D and Y6 obtained here and additional sequences obtained from GenBank: 84 sequences of the 14 SCYLV isolates described on table 1 and 198 sequences of 79 partially sequenced isolates (Abu Ahmad et al. 2006a, Supplementary table 1). The 10 partial ORFs sequences were obtained and aligned with DNAMAN Sequence Analysis Software. These 10 partial ORF sequences were named according to the covered ORFs and genome fragments as follows: ORF0/Y1R, ORF0/A, ORF1/A, ORF1/B, ORF2/B, ORF2/Y4, ORF3/Y4C, ORF4/Y4C, ORF5/D and ORF5/Y6. The number of analyzed sequences for each partial ORF varied according to the number of sequences available for each fragment as indicated in figure 1.

The method used for measuring the selective pressure on protein-coding sequences was previously described (Yang and Bielawski 2000; Hurst 2002; Moury et al. 2002). The ratio (ω) of nonsynonymous (amino acid-altering) to synonymous (silent) substitution rates provides an estimate of the selective pressure on the encoded protein (Kimura 1983). A maximum-likelihood (ML) method that utilizes models of sequence evolution can be employed to calculate ω ratios and to identify amino acid sites as conserved, neutral, or positively selected (Yang et al. 2000). Instead of averaging ω across all codon sites, Yang et al.'s (2000) method allows estimations of ω on a codon-by-codon basis. This method originally employed 14 models that use statistical distributions to account for variable ω ratios among codon sites. Models M0, M1, M2, M3, M7, and M8 were shown to be sufficient for accurate selection analysis (Yang et al. 2000). Models M0, M1, and M7 do not allow for the existence of positively selected sites. M0 calculates a single ω ratio (between 0 and 1) averaged over all sites, M1 accounts for neutral evolution by estimating the proportion of conserved ($\omega = 0$) and neutral ($\omega = 1$) sites, and M7 uses a discrete beta distribution between 0 and 1 to model different ω ratios between sites. Alternatively, models M2, M3, and M8 account for positive selection by using parameters that can estimate $\omega > 1$. Models M2 and M8 extend M1 and M7, respectively, through the addition of two parameters that have the potential to estimate $\omega > 1$ for an extra class of sites. M3 provides the most sensitive test for positive selection by estimating an ω ratio for a predetermined number of classes (three in these analyses). The first step in identifying amino acid sites under positive selection is to test whether sites exist with $\omega > 1$ by application of likelihood ratio tests (LRTs) to compare nested models. M0 and M1 are both special cases of M2 and M3, and M7 is a special case of M8. Such nested models can be compared by LRTs (Anisimova et al. 2001). Once positively selected sites have been shown to exist, the second step is to use Bayesian methods to locate their position using NEB and BEB (Nielsen and Yang, 1998). Sites having high posterior

probabilities ($P > 90\%$) of belonging to a site class with $\omega > 1$ are good candidates for positively selected sites. The methods and models described here were implemented within the CODEML program of the PAML version 3.0c package (Yang 1997). To avoid artifactual detection of positive selection, occurrence of substitution saturation at the three positions in the codons and recombination events within the different partial ORFs were checked, as previously described (Moury et al. 2002).

Evolutionary rate shifts among SCYLV genotypes

Evolutionary rate shifts among SCYLV genotypes were determined with three partial ORF sequences described above: ORF1/A, ORF2/B, and ORF5/D. Comparison of evolution rate at the nucleotide level between genotypes BRA, PER, and REU, was done with molecular clock tests (Yoder and Yang 2000; Yang and Yoder 2003). Since this method needs a rooted tree, the Cuba sequences were used as an outgroup.

The global clock models with one constant rate of substitution along the branches were compared, using LRT, to the local clock models for which one particular virus genotype has a different rate than the other genotypes. It was not possible to align SCYLV sequences to the sequence of any other *Luteoviridae* viruses. For this reason, the most divergent genotype (CUB) was used as an outgroup in these analyses.

Results

Variability of SCYLV

The six ORFs of virus isolates COL-YL1a, COL-YL1b, CUB-YL1a, and CUB-YL1b were sequenced, and the sequences of these isolates belonging to SCYLV genotype CUB were compared to the corresponding sequences of 10 other SCYLV isolates available in Genbank, and belonging to genotypes BRA, PER and REU. Phylogenetic analysis of the entire translated genome (ORFs 0-5) sequences of the 14 isolates showed that isolates were distributed in four groups separated by maximum bootstrap values. Each group corresponded to a different genotype, thus confirming assignment of the virus isolates to the different genotypes (fig. 2).

Within each ORF and each genotype, nucleotide sequence identity and amino acid sequence similarity varied from 98.2 - 100 % and from 92.2 - 100 %, respectively (table 2). Isolate nucleotide sequence identity and isolate amino acid sequence similarity among genotype CUB and the other three genotypes were higher than 92.8 % for ORFs 2, 3 and 4, but lower than

83.5 % for ORFs 0, 1 and 5. Additionally, several anomalies were detected in the nucleotide sequence of SCYLV isolates. Unusual termination codons, leading to translation of truncated ORFs and making necessary read-through for translation of the complete ORFs, were found at the same positions in ORF 0 of isolates CUB-YL1a and CUB-YL1b, and in ORF 2 of isolates COL-YL1b and CUB-YL1a (figure 1). Two indel codons were also found in ORF1 and ORF 5.

Recombination analyses

We looked for recombination events in the entire translated genome sequences (ORFs 0-5) of the 14 virus isolates, and in sequences of fragments A, B and D sequences of 51, 73 and 38 isolates of SCYLV, respectively. These isolates represented all four SCYLV genotypes (BRA, CUB, PER, and REU). Firstly, the sequence alignments were screened for evidence of recombination. Six different detection methods were used to identify the presence of recombination events involving SCYLV sequences as either donors or acceptors of sequences, and at least 22 events were identified by RDP2 (tables 3 and 4). Secondly, the recombination events with multiple comparison corrected P values < 0.05 were selected. Four recombination regions were then identified and designated I, II, III and IV (fig. 1, tables 3 and 4). Identified recombination events involved several isolates such as BRA-YL1a (genotype BRA), PER-YL1a (genotype PER), COL4 (genotype BRA), REU42 (genotype BRA) and CHN-YL1 (genotype BRA) with parent isolate REU-YL2 or REU-YL1b (genotype REU).

Evidence for positive selection in SCYLV proteins

In order to better understand the evolution of each genotype during evolution of SCYLV, we further investigated the molecular diversity of this virus and estimated the selective pressure exerted on each ORF. The estimated parameters and the codon model comparisons are presented in table 5 and supplementary table 2. Ten partial ORFs were deduced from the nucleotide sequence of eight genome fragments (Y1 or R, A, B, C or Y4, D, and Y6) and the number of analyzed sequences for each partial ORF varied according to the number of sequences available for each fragment (fig. 1). For partial ORFs ORF0/A, ORF1/A, ORF1/B, ORF2/B and ORF5/D, model M0 fitted the data significantly less than M1, indicating a significant ω ratio variation between codons. Positive selection was found by M2, M3 and M8 models for ORF0/A, ORF1/A, and ORF1/B, by only M8 model for ORF2/B and only M8 model for ORF5/D. Furthermore, if models M1 or M7 are rejected among these five partial ORFs, then the positively selected sites

can be detected. This is accomplished by computing the posterior probability that a particular site has a value of $\omega > 1$ under the parameter estimates of the M2, M3 or M8 models through Naïve Empirical Bayes (NEB) and Bayes Empirical Bayes (BEB) analyses using an empirical Bayes approach (table 5 and supplementary table 2, fig. 1). ORF0/A, and ORF1/B had higher ω values of the positive ω class in model M8 (mean ω values > 5) and a higher percentage of positively selected codons (30% and 16% respectively) than ORF1/A, ORF2/B and ORF5/D ($\omega = 4.0, 2.1$ and 1.7 respectively, and 1%, 3% and 1% codons respectively) (table 5).

Location of codons undergoing positive selection (UPS) appeared not being uniformly distributed along the SCYLV genome, but are rather concentrated in the overlapping regions of ORF 0/1 and ORF 1/2 (fig. 1). Although ORFs 3 and 4 are entirely overlapping, no UPS codon was found in these ORFs. Fifty-five percent of ORF 0 UPS codons and 32% of total UPS codons contain a nonsynonymous mutation exclusively in genotype CUB. These characteristics are most likely involved in divergence of genotype CUB from the other three genotypes.

Interestingly, three codons substitutions were identified as positive selection sites in each reading frames of overlapping ORFs 0/1 and 1/2, confirming the selective pressure on these three mutation sites. The three corresponding overlapping UPS codons pairs are (i) codon 123 in ORF 0 that overlapped with codon 65 in ORF 1, (ii) codon 252 in ORF 0 that overlapped with 194 ORF 1 and (iii) codon 558 in ORF 1 that overlapped with 61 ORF 2. Furthermore, in overlapping regions, 66% of synonymous substitutions identified as UPS codons in a reading frame corresponded to nonsynonymous mutations in the other reading frame, supporting that overlapping ORFs evolved independently.

M0 is a model that assumes constant ω values among codons and along evolutionary branches that separates isolates. It was used to estimate the mean ω value of each ORF and to test a change in selective pressure between the different ORFs of SCYLV (table 5). The ω value of partial ORF0/A, ORF1/B and ORF2/B was higher and contained more positive selection codons than the other partial ORFs analyzed. This difference is probably caused by the presence of more positively selected codons in these fragments, artificially increasing the mean ω value. ORF 4 entirely overlaps ORF 3 thus imposing very strong selective constraints on both ORF evolution. Despite that, ω of ORF 4 (0.65) was quite high, and higher than ω of ORF 3 (0.32). In this case, no codon under positive selection was detected by the models in these overlapping ORFs, thus the twofold difference observed in ω value is probably not an artifact, and may be explained by, a twice as effective efficient selective constraints on ORF3 (coding for CP) than on ORF 4 (coding for MP) may explain the twofold difference in ω value.

Other models implemented in CODELM of the PAML package were used to compare the mean ω values of the branches linking a particular SCYLV group (REU, PER or BRE) against ω of branches in the rest of the phylogenetic tree (including CUB isolates). These models were then compared by LRT to null models where all taxa (= all sequences analyzed for each partial ORF) share the same ω value. Parameters estimates and results of the LRT are given in supplementary table 2. None of ORFs 1, 2 or 5 of the tested genotypes (BRA, PER, REU) had an ω value significantly different from the remaining taxa. The highest ω value was nevertheless observed for the isolates of genotype PER in ORFs 2 and 5, when compared to isolates of the two other genotypes and to the rest of the taxa. This relative increase of ω in genotype PER did not appear to be caused by the occurrence of more positively selected sites in ORFs 2 and 5 (6 and 3 codons, respectively) when compared to the other isolates (genotype REU: 8 and 5, genotype BRA: 7 and 1, data not shown). One can therefore hypothesized that the relative increase of ω in genotype PER is due to a relaxation of the selective pressure on this group compared to the two others.

Molecular clock tests are used here to test a differential between ORF 1s, 2 and 5 and among genotypes BRA, PER and REU, in molecular evolution speed *ie.* the amount of nucleotide replacements (synonymous plus non synonymous changes). Clock models use the same principle than branch models, but take into account heterogeneity of molecular evolution rate instead of ω rate. Local clock models, where all branches leading to a particular genotype has a different evolution rate than the rest of the tree is compared to global clock model assuming a constant evolution rate along the tree. These nested models are then compared with LRT, as described in supplementary table 2. The local clock models fit significantly better the data than the global models, except for ORF1/A of genotypes BRA and REU. Apart from these 2 cases, the evolution rate of genotypes REU, BRA or PER was always higher than the rest of the tree, suggesting a faster evolution of these three genotypes compared to genotype CUB (the outgroup in our analyses). Additionally, ORF1/A evolved five times ($r_1 = 5.75$) faster in genotype PER than in genotypes REU and BRA (table 6). This difference can be explained for genotypes PER and BRA by a concomitant increase of d_N and d_S whereas ω values of these two genotypes were similar (0.30 and 0.29, respectively) (table 6). ORF2/B and ORF5/D of genotype BRA evolved two times and 1.5 times faster than the same partial ORFs of genotypes PER and REU, respectively.

Discussion

We have shown herein that the amino acid sequence of ORFs 0, 1 and 5 is highly variable among 14 isolates of SCYLV, especially between isolates of genotype CUB and isolates of genotypes BRA, PER and REU (less than 80% of amino acid sequence similarity). The high divergence observed in ORFs 0 and 5 may result from an adaptation to the sugarcane species and adaptation to aphid transmission, respectively. Conversely, more than 90% of amino acid sequence similarity was found among amino acid sequences of ORFs 2, 3 and 4. According to the classification of *Poleroviruses* of family *Luteoviridae* established by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), two polerovirus isolates differing by at least 10% in the amino acid sequence of any ORF belong to two different virus species (D'Arcy and Domier 2005). Based on this definition, the four isolates of genotype CUB (COL-YL1a and COL-YL1b from Colombia, and CUB-YL1a and CUB-YL1b from Cuba) do not belong to SCYLV, but to another virus species. Because these isolates and SCYLV isolates cause the same symptoms of yellow leaf, we suggest the addition of "Cuba" (first location where this new species was found) to the SCYLV acronym, and to name Sugarcane yellow leaf Cuba virus (SCYLCV) this new virus species.

Results of recombination analysis showed that at least four major recombination regions exist in SCYLV: one in the overlapping region ORF 0/ORF 1, and three in the non-overlapping region of ORFs 1, 2 and 5 (fig. 1). These data suggest that SCYLV isolates evolved in different isolated geographical locations. The isolate of COL4 was detected as recombinant resulting of recombination between the parents of TAIW1, REU2 and CHN-YL1. This event was detected by four methods of RDP2 package and with a P value of 4.78×10^{-5} . Additionally, a substantial migration of SCYLV isolates of Reunion Island such as REU-YL2, and isolates of genotypes BRA and PER from other geographical locations, was demonstrated in this study. It can be hypothesized that genetic exchange between the four genotypes occurred in the past in different geographic locations, especially in Réunion Island, Peru and Brazil. When and where these potential recombination events occurred is an open question and needs to be elucidated.

Attempts to identify sequences which are subjected to negative, neutral or positive selection are necessary to assess the major constraints exerted on evolution of a virus (Yang and Bielawski, 2000), such as the vector or the host-plant genetic background (Chare and Holmes, 2004; Moury, 2004). The ML method implemented in PAML (Yang 1997) was used to detect variations in the ω ratio between codon sites. The multiple models of heterogeneous selective pressures among sites allowed us to detect strong positive selection in ORFs 0 and 1 of SCYLV (ω values ranging from 4 to 6 for some codons), and moderate positive selection in ORFs 2 and 5

($\omega < 2$). These data for ORFs 0 and 1 appeared robust because 1) corresponding tests showed high statistical significance, 2) the codon evolution models M2, M3 and M8 all agreed this result and 3) intensity of selection was strong for almost all codons evolving under positive selection.

Overlapping open reading frames were firstly considered as a means to maximize the genetic information in the small genome of RNA viruses (Jordan et al. 2000), and secondly as a constraint on the variability of these concurrent genes (Bilsel et al. 1990; Ina et al. 1994). In the genome of SCYLV, we found that intensity of positive selection was higher in overlapping regions ORF 0/ORF 1 and ORF 1/ORF 2 than in non-overlapping regions. These results were different from those demonstrated in ORF0/ORF1 of the PLRV genome (Guyader and GIBLOT-DUCRAY, 2002). At least six amino acids position under positive selection in overlapping ORFs, and which resulted in site changes in the consecutive ORF (also under positive selection), were detected in SCYLV by at least two models. This result probably revealed an interaction between these sites in ORFs 0 and 1, and in ORFs 1 and 2 that are involved in virus replication, suggesting a directional selection and accumulation of mutations. Comparison of ORFs 3, that encodes CP, and ORF 4, that encodes MP (fig. 1), revealed that MP is more constrained than CP in SCYLV. These results were different from those found in *Potato leafroll virus* (PLRV) in which ORF 3 appeared more conserved than ORF 4 (Guyader and GIBLOT-DUCRAY 2002). Additionally, low diversity in ORF 3 and 4 of SCYLV suggests high selective pressure exerted on the evolution of CP and MP (Guyader and GIBLOT-DUCRAY 2002; Torres et al. 2005). Mutational studies showed that sites under purifying selection and coding for CP surface amino acids are essential for the biology of the luteoviruses, and mutation analyses of exposed sites of BWYV's CP also recognized its function in RNA packaging, virus accumulation and aphid transmission. Amino acid sites that are essential for well-functioning of CP (Brault et al. 2003; Lee et al. 2005)) were found under negative selection by Torres et al (2005). Therefore, the purifying selection ($\omega < 1$) acting on CP of *Luteoviridae* could result from constraints imposed by receptors of the aphid and the host plant, which limit structural changes. Generally, evolution of viral genes is characterized by enormously high speed compared with that of nuclear genes of eukaryotic organisms (Gojobori et al. 1990). Evolutionary rates and patterns of base substitutions analyzed herein showed that heterogeneous selective forces acting on the different ORFs in the SCYLV genome establish bridges between sequence data and biological function, and can also be useful in identifying candidate sites for point mutation studies in this virus genome.

In plant viruses, changes in the rate of selective pressure of an ORF can be observed after a change affecting the virus vector or its host plant(s). Virus migration via infected plants transfers can trigger such changes. The consequence for the virus will then depend on its ability to adapt

to this new environment, thus leading to visible marks of positive selection on the genome of the virus population. All these evolutionary events detected in the different ORFs of the SCYLV genome, contribute to and shape the historical evolution of this sugarcane virus.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Michel Peterschmitt for helpful discussions. This research was conducted during the thesis scholarship program of Youssef Abu Ahmad, supported by the Government of Syrian Arabic Republic and CENICAÑA in Colombia.

Literature Cited

- Abu Ahmad Y, Rassaby L, Royer M, Borg Z, Braithwaite KS, Mirkov TE, Irej MS, Perrier X, Smith GR, Rott P, 2006a. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. *Arch. Virol.* 151 :1355-71.
- Abu Ahmad Y, Royer M, Daugrois J-H, Costet L, Lett J-M, Victoria JI, Girard J-C, Rott P. 2006b. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Dis.* (in press).
- Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z. 2001. Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol Biol Evol* 18: 1585-92
- Bilsel PA, Rowe JE, Fitch WM, Nichol ST. 1990. Phosphoprotein and nucleocapsid protein evolution of vesicular stomatitis virus New Jersey. *J Virol* 64:2498-504.
- Bishop JG., Dean AM, Mitchell-Olds T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5322-27.
- Borg Z, Moonan F, Braithwaite K, Mirkov TE, Smith G. 2001. Characterising the genetic diversity of sugarcane yellow leaf virus. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol Congr* 24:654-6.
- Brault V, Bergdoll M, Mutterer J, Prasad V, Pfeffer S, Erdinger M, Richards KE, Ziegler-Graff V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J Virol* 77:3247-56
- Chare ER, Holmes EC. 2004. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. *J Gen Virol* 85:3149-57.
- Chatenet M, Delage C, Ripolles M, Irej M, Lockhart BEL, Rott, P. 2001. Detection of Sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis* 85:1177-80.

- 472 Comstock JC, Irely MS, Lockhart BEL, Wang ZK. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in
473 CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane*
474 4:21-4.
- 475 D'Arcy CJ, Domier LL. 2005. Luteoviridae. Pp. 891-900. *in*: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff
476 J, Desselberger U, Ball LA eds. *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International
477 Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London.
- 478 Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for
479 assessing signals in recombinant sequences. *Bioinform* 16:573-82.
- 480 Gojobori T, Morijama EN, Kimura M. 1990. Molecular clock of viral evolution, and the neutral
481 theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:10015-8
- 482 Guyader S, Giblot-Ducray D. 2002. Sequence analysis of *Potato leafroll virus* isolates reveals
483 genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between
484 overlapping reading frame products. *J Gen Virol* 83:1799-807.
- 485 Haydon DT, Bastos AD, Knowles NJ, Samuel AR. 2001. Evidence for positive selection in foot-
486 and-mouth-disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics* 157:7-15.
- 487 Hurst LD. 2002. The Ka/Ks ratio: Diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet.* 18:
488 486-7.
- 489 Ina Y, Mizokami M, Ohba K, Gojobori T. 1994. Reduction of synonymous substitutions in the
490 core protein gene of hepatitis C virus. *J Mol Evol* 38:50-6.
- 491 Jordan IK, Sutter BAIV, McClure MA. 2000. Molecular evolution of the *Paramyxoviridae* and
492 *Rhabdoviridae* multiple-protein-encoding *P* gene. *Mol Biol Evol* 17:75-86.
- 493 Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions
494 through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120
- 495 Kimura M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press,
496 Cambridge, United of Kingdom.
- 497 Knudsen B, Miyamoto MM. 2001 A likelihood test for evolutionary rate shifts and functional
498 divergence among proteins. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 14512-14517.
- 499 Lockhart BEL, Cronjé CPR. 2000. Yellow leaf syndrome. Pp 291-295 *in*: Rott P, Bailey RA,
500 Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS eds. *A guide to sugarcane diseases*. La Librairie du
501 Cirad, Montpellier.
- 502 Mangwende T, Mirkov ET, Albert HH. 2005. The P0 protein of sugarcane yellow leaf virus is a
503 suppressor of posttranscriptional gene silencing. *International Plant & Animal Genomes XIII*
504 *Conference Proceedings*. Abstract A161, P38.

- 505 Martin D, Rybicki E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences.
- 506 Bioinform 16:562–3.
- 507 Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. 2005a. A modified bootscan algorithm for
- 508 automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. AIDS
- 509 Res Hum Retroviruses 21: 98–102.
- 510 Martin DP, Williamson C, Posada D. 2005b. RDP2: recombination detection and analysis from
- 511 sequence alignments. Bioinform 21: 260–2.
- 512 Mayo MA, Robinson DJ, Jolly CA, Hyman L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll
- 513 luteovirus RNA. J Gen Virol. 70:1037–51.
- 514 Moonan F, Molina J, Mirkov TE. 2000. Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has
- 515 evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. Virol 69:156–71.
- 516 Moonan F, Mirkov TE. 2002. Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central
- 517 American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: Evidence for Colombian origins and for
- 518 intraspecific spatial phylogenetic variation. J Virol 76:1339–48.
- 519 Moury B, Morel C, Johansen E, Jacquemond M. 2002. Evidence for diversifying selection in
- 520 potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. J Gen Virol 83:2563–73.
- 521 Moury B. 2004. Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups. Mol Biol
- 522 Evol 21:1602–11.
- 523 Nielsen R, Yang ZH. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites
- 524 and applications to the HIV-1 envelope gene. Genetics 148 :929–36.
- 525 Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by
- 526 frequent recombination. Virology 265:218–25.
- 527 Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irely MS, Lockhart BEL, Kodja H, Rott P, 2003.
- 528 Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island.
- 529 Eur J Plant Pathol 109, 459–66.
- 530 Rott P, Comstock JC, Croft BJ, Kusilwong A, Saumtally SA, 2005. Advances and challenges in
- 531 sugarcane pathology. Proc Intl Soc Sugarcane Technol Congress 25: 607–14.
- 532 Scagliusi SM, Lockhart BEL. 2000. Transmission, characterization, and serology of a luteovirus
- 533 associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. Phytopathol. 90:120–4.
- 534 Schenck S, Lehrer AT. 2000. Factors affecting the transmission and spread of Sugarcane yellow
- 535 leaf virus. Plant Dis 84:1085–88.
- 536 Smith GR, Borg Z, Lockhart BEL, Braithwaite KS, Gibbs MJ. 2000. Sugarcane yellow leaf
- 537 virus: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species
- 538 recombination. J Gen Virol 81:1865–69.

- 539 Smith JM. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34:126–9.
- 540 Torres1 MW, Corrêa RL, Schrago1 CG. 2005. Analysis of differential selective forces acting on
- 541 the coat protein (P3) of the plant virus family Luteoviridae. *Genet Mol Res* 4 (4): 790-802.
- 542 van der Wilk F, Houterman P, Molthoff J, Hans F, Dekker B, van den Heuvel J, Huttinga H,
- 543 Goldbach R. 1997. Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like
- 544 symptoms in transgenic potato plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:153-9.
- 545 Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of
- 546 association with a luteovirus. *Plant Dis* 81:21-6.
- 547 Veidt I, Lot H, Leiser M, Scheidecker D, Guilley H, Richards K, Jonard. 1988 Nucleotide sequence of beet western yellows virus
- 548 RNA. *Nucleic Acids Res* 16(21): 9917–32.
- 549 Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AMK. 2000 Codon-substitution models for
- 550 heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155:431-49.
- 551 Yang Z, Wong WSW, Nielsen R. 2005. Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites
- 552 under positive selection. *Mol Biol Evol* 22:1107-1118.
- 553 Yang Z, Yoder AD. 2003. Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating
- 554 divergence times using multiple gene loci and calibration points, with application to a
- 555 radiation of cute-looking mouse lemur species. *Systematic Biol* 52:705-16.
- 556 Yang Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood
- 557 Computer Applications in BioSciences 13:555-6
- 558 Yang Z. 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate
- 559 lysozyme evolution. *Mol Biol Evol* 15:568-573.
- 560 Yang, Z. & Bielawski. 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol*
- 561 *Evol* 15:496–503.
- 562 Yoder AD, Yang Z. 2000. Estimation of primate speciation dates using local molecular clocks.
- 563 *Mol Biol Evol* 17:1081-90.
- 564 Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer JD, Simonis MT, Herrbach E, Guilley H, Richards KE,
- 565 Jonard G. 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic
- 566 infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and
- 567 aphid transmission. *Mol Plant-Microbe Interact.* 9:501-10.

Table 1**Characteristics of the 14 isolates of SCYLV used in phylogenetic analyses**

SCYLV Isolate ^a	Geographical origin	Sugarcane host cultivar	Genbank accession number
BRA-YL1a	Brazil	SP71-6163	AM072750
BRA-YL1b	Brazil	SP71-6163	Requested
CHN-YL1	China	CGT63-167	AM072751
<i>COL-YL1a</i>	<i>Colombia</i>	<i>CC87-505</i>	<i>This study</i>
<i>COL-YL1b</i>	<i>Colombia</i>	<i>CC87-505</i>	<i>This study</i>
<i>CUB-YL1a</i>	<i>Cuba</i>	<i>C132-81</i>	<i>This study</i>
<i>CUB-YL1b</i>	<i>Cuba</i>	<i>C132-81</i>	<i>This study</i>
SCYLV-IND	India	-	AY236971
PER-YL1a	Peru	H50-7209	AM072752
PER-YL1b	Peru	H50-7209	AM072753
REU-YL1a	Réunion Island	R570	AM072754
REU-YL1b	Réunion Island	R570	AM072755
REU-YL2	Réunion Island	R490	AM072756
SCYLV-A	Texas	CP65-357	AF157029

^a Isolates in italics were amplified and sequenced in this study.

572 **Table 2**
 573 **Nucleotide sequence identity and amino acid sequence similarity of pairwise combinations of BRA, CUB, PER and REU genotypes for**
 574 **ORFs 0, 1, 2, 3, 4, and 5**

% of nucleotide sequence identity

% of amino acid sequence similarity

	ORF 0				ORF 1				ORF 2			
	BRA	PER	REU	CUB	BRA	PER	REU	CUB	BRA	PER	REU	CUB
BRA	98.2-100 92.2-99.6	97.4-98.0 91.4-96.5	95.7-96.6 91.0-96.9	76.9-78.0 66.7-71.1	98.4-99.8 96.9-99.7	96.5-97.4 94.9-95.8	93.9-94.7 93.7-96.0	83.2-83.5 78.6-79.7	98.9-99.9 98.9-99.8	97.4-98.2 97.9-98.6	94.5-95.6 96.0-97.0	92.8-93.3 93.9-95.4
PER		99.9-99.9 99.2-99.2	95.8-96.2 94.9-95.3	77.0-77.4 70.6-70.7		99.5-99.5 99.1-99.1	93.1-93.8 93.1-93.2	82.5-82.9 77.8-78.0		99.8-99.8 99.5-99.5	94.2-94.4 96.0-96.5	92.1-92.2 93.5-94.7
REU			98.7-100 96.5-99.2	77.8-78.1 71.0-71.9			98.6-99.9 98.0-99.8	82.6-83.1 78.3-78.6			99.0-99.4 98.9-99.5	93.1-93.7 93.7-95.1
CUB				98.3-99.9 97.3-99.2				98.9-99.8 97.8-99.5				99.1-99.7 98.2-99.6
	ORF 3				ORF 4				ORF 5			
	BRA	PER	REU	CUB	BRA	PER	REU	CUB	BRA	PER	REU	CUB
BRA	99.0-100 98.5-100	98.8-99.3 98.0-99.0	98.5-99.2 99.0-100	95.3-95.9 93.9-95.9	98.9-100 98.7-100	98.7-99.3 98.0-99.3	99.3-100 98.7-100	96.5-97.4 96.0-98.0	98.0-98.7 97.5-100	95.7-96.1 95.0-96.5	92.5-93.6 93.7-95.8	82.7-83.5 79.9-82.8
PER		100 100	98.3-98.5 99.0-99.0	95.4-95.8 94.9-94.9		100 100	99.3-99.3 99.3-99.3	96.9-97.1 96.7-97.3		100-100 99.8-99.8	92.9-93.0 93.5-94.6	82.6-83.0 79.5-81.0
REU			99.8-100 100	95.8-96.1 94.9-99.0			100 100	97.1-97.4 97.3-98.0			99.0-100 98.3-99.6	82.4-82.9 79.5-82.0
CUB				99.3-100 98.5-100				99.3-100 99.3-100				98.5-99.5 96.7-98.5

576 **Table 3**

577 **Recombinant regions detected within 14 isolates of SCYLV by comparison of**
 578 **entire translated genome sequences (ORFs 0-5, 5606- 5612 nt)**

Event number	Genome position	Region	Daughter	Parental sequences		Detected by	P-value
				Minor	Major		
1	1497-1652	II	PER-YL1a	un known (COL-YL1a)	REU-YL2	RB	1.26×10^{-3}
2	1501-1649	II	BRA-YL1a	un known (COL-YL1a)	REU-YL2	RB	1.58×10^{-3}
3	1504-1652	II	BRA-YL1b	un known (COL-YL1a)	REU-YL2	RB	1.58×10^{-3}
4	3001-3205	III	SCYLV-IND	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
5	3001-3205	III	SCYLV-A	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
6	3001-3205	III	CHN-YL1	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
7	3001-3205	III	CHN-YL1	un known (CUB-YL1a)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
8	3001-3205	III	BRA-YL1b	un known (COL-YL1a)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
9	3001-3205	III	BRA-YL1b	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
10	3001-3205	III	PER-YL1a	un known (CUB-YL1b)	REU-YL1b	RBC	1.26×10^{-2}
11	3001-3205	III	PER-YL1a	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
12	3001-3205	III	PER-YL1b	un known (CUB-YL1b)	REU-YL1b	RBC	1.26×10^{-2}
13	3001-3205	III	PER-YL1b	un known (CUB-YL1b)	REU-YL2	RBC	1.26×10^{-2}
14	2997-3201	III	BRA-YL1a	un known (COL-YL1a)	REU-YL2	RMC	1.26×10^{-2}

579

580 Regions were determined by nucleotide positions of detected recombination breakpoints in
 581 the multiple sequence alignment used to detect recombinations (fig.1). Daughter and parental
 582 sequences identified as 'Major' and 'Minor' parents are sequences used to identify
 583 recombination with indicated recombinant sequences. For each identified event, the minor
 584 parent is the apparent contributor of the sequence with the indicated region, and the major
 585 parent is the apparent contributor of the rest of the sequence. All recombinant regions and
 586 parental isolates were identified using RDP (R), Geneconv (G), Bootscan (B), Max chi (M),
 587 Chimaira (C) and Siscan (S) methods of RDP-V2 package (Martin and Rybicki, 2000). The

Table 4

Recombinant regions detected by comparison of sequences of fragments A and D

Fragment	Event	Genome position	Region	Daughter	Parental sequences		Detected by	P-value
					Minor	Major		
A	15	281-437	I	REU42	REU-YL3	CHN-YL1	RGBS	8.69×10^{-3}
	16	281-437	I	REU42	REU40	CHN-YL1	RGBS	8.69×10^{-3}
	17	1498-1658	II	PER-YL1a	un known (COL-YL1b)	REU-YL2	RB	1.24×10^{-2}
	18	1498-1658	II	PER-YL1b	un known (COL-YL1b)	REU-YL2	RB	1.24×10^{-2}
	19	1505-1653	II	BRA-YL1a	un known (COL-YL1b)	REU17	RGBS	1.65×10^{-2}
	20	1505-1653	II	USA2	un known (COL-YL1b)	REU26	RB	1.65×10^{-2}
D	21	5591-5645	IV	COL4	REU2	CHN-YL1	GBMC	4.36×10^{-5}
	22	5591-5645	IV	COL4	REU2	TAIW 1	GBMC	4.36×10^{-5}

Regions were determined by nucleotide positions of detected recombination breakpoints in the multiple sequence alignment used to detect recombinations (fig.1). Daughter and parental sequences identified as 'Major' and 'Minor' parents are sequences used to identify recombination with indicated recombinant sequences. For each identified event, the minor parent is the apparent contributor of the sequence with the indicated region, and the major parent is the apparent contributor of the rest of the sequence. All recombinant regions and parental isolates were identified using RDP (R), Geneconv (G), Bootscan (B), Max chi (M), Chimaira (C) and Siscan (S) methods of RDP-V2 package (Martin and Rybicki, 2000).

The reported *P*-value is for the method in bold type and is the best *P*-value calculated for the region in question.

Table 5

Parameters estimations of the different ML models used to detect positive selection in the 10 partial ORFs, and model comparisons with likelihood ratio tests

Partial ORF	Position in the genome (nt)	$2\Delta\ln L^1$				d_N/d_S^2	ω max	N_P	$N_{P\ SCYLCV}$	N_{PO}	N_{POS}
		M0 vs M1	M1 vs M2	M1 vs M3	M7 vs M8						
ORF0/Y1R	67-267	3.82	0.00	2.88	0.00	0.10	1.00	0	-	-	-
ORF0/A	268-834	37.65^a	24.16^a	24.26^a	26.27^a	0.69	5.70	20	11 (55%)	20 (100%)	3 (15%)
ORF1/A	266-1840	167.20^a	33.62^a	34.58^a	47.94^a	0.28	3.95	6	2 (33%)	3 (50%)	1 (33%)
ORF1/B	1535-2191	11.62^b	19.57^a	21.85^a	20.17^a	1.15	5.26	19	3 (15%)	19 (100%)	9 (47%)
ORF2/B	1735-2688	57.25^a	6.01^d	6.08	12.92^c	0.30	2.09	10	2 (20%)	5 (50%)	3 (60%)
ORF2/Y4	2713-3450	0.42	0.00	0.42	0.00	0.10	1.00	0	-	-	-
ORF3/Y4C	3687-4221	1.27	1.79	1.83	1.90	0.34	13.10	0	-	-	-
ORF4/Y4C	3688-4128	2.09	1.27	1.27	1.35	0.65	2.14	0	-	-	-
ORF5/D	4395-5644	77.24^a	2.51	2.66	11.38^c	0.23	1.67	5	1 (20%)	0 (0%)	-
ORF5/Y6	5646-5675	$-5.2 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	0.006	1.01	1.08	0	-	-	-
Total								60	19 (32%)	47 (78%)	16 (34%)

N_P = Number of positively-selected codons obtained from models M2, M3 or M8 when LRT was significant and P -value > 95% (posterior probabilities to belong to a positively selected class).

- 606 N_{PSCYLCV} = Number of positive codons with nonsynonymous mutations exclusively present in genotype CUB (percentages of these codons out
607 of total positive codons are indicated in parentheses).
- 608 N_{PO} = Number of positive codons present in an overlapping coding region (percentages of these codons out of total positive codons are indicated
609 in parentheses).
- 610 N_{POS} = Number of positive codons for which the nonsynonymous mutation has corresponding synonymous mutation in the overlapping ORF
611 (percentages of these codons out of positive codons present in overlapping regions are indicated in parentheses).
- 612 ¹ The statistics $2\Delta\ln L$ (twice the difference in log-likelihood between the two models tested) is compared with a χ^2 table. The most parametered
613 model rejects the alternative model when $2\Delta\ln L$ is higher than the tabulated χ^2 (M0 vs M1: 1 df, M1 vs M2: 2 df, M1 vs M3: 3 df and M7 vs M8:
614 2df), according to Yang et al. (2000). In bold: the value $|\Delta\ln L|$ is significantly higher than the tabulated χ^2 . **a:** $P < 10^{-4}$, **b:** $P < 0.001$, **c:** $P < 0.01$,
615 **d:** $P < 0.05$.
- 616 ² The d_N/d_S ratio are the mean values obtained for model M8, except ORF2a: model M2 and ORF5a: model M3.

617 **Table 6**

618 **Comparison of (A) the evolution rate using molecular clock tests, and (B) the mean ω ratio of partial ORFs ORF1/A, ORF2/B and**
 619 **ORF5/D of the three SCYLV phylogenetic groups (BRA, PER and REU)**

A		Molecular clock tests ^a								
		ORF1/A			ORF2/B			ORF5/D		
		REU	PER	BRA	REU	PER	BRA	REU	PER	BRA
Global Clock ^b	<i>lnL</i>	-6412.27			-3454.24			-4853.86		
Local clock ^c	<i>lnL</i>	-6412.27	-6376.71	-6412.27	-3449.37	-3447.25	-3430.27	-4827.94	-4842.37	-4813.73
	<i>r1</i>	1.00	5.75	1.00	2.13	2.79	4.48	3.54	2.66	4.35
	<i>r0</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LRT ^d	$2\Delta lnL$	0.00	71.11	0.00	9.75	13.98	47.95	51.84	22.98	80.26
B		Branch models ^a								
		ORF1/A			ORF2/B			ORF5/D		
		REU	PER	BRA	REU	PER	BRA	REU	PER	BRA
1 ratio ^c (R1)	<i>lnL</i>	-6345.16			-3271.99			-4457.68		
	ω	0.29			0.29			0.23		
2 ratios ^d (R2)	<i>lnL</i>	-6344.38	-6345.15	-6345.15	-3271.99	-3271.81	-3271.94	-4456.93	-4456.71	-4457.50
	$\omega 1$	0.25	0.30	0.29	0.29	0.36	0.28	0.19	0.33	0.21
	$\omega 0$	0.31	0.29	0.29	0.29	0.28	0.30	0.25	0.22	0.24
LRT ^e	$2\Delta lnL$	1.55	0.02	0.004	0.001	0.36	0.11	1.49	1.94	0.36

620

621 ^a: Both molecular clock tests and Branch models are taken from CODEML in PAML (Yang 1997).

622 ^b: The 1 ratio models assume one constant evolution rate (for molecular clock) and ω rate (W, for branch models) along all branches of the
 623 phylogenetic tree.

- 624 ^c: The two ratio models assume the SCYLV group of interest: REU, PER or BRA has a different evolution rate (r_1) or ω rate (ω_1), than the
 625 remaining taxa (r_0 and ω_0).
 626 ^d: Likelihood ratio tests compare the global clock to the global clock models using the statistics $2\Delta\ln L$ (1df).
 627 ^e: Likelihood ratio tests compare models R1 and R2 using the statistics $2\Delta\ln L$ (R1 vs R2:1df).
 628

629 **Supplementary table 1**630 **Characteristics of the 79 partially sequenced isolates of SCYLV used in this study**

Location	Isolate*	Sugarcane host cultivar	Fragments and accession number			
			A	B	Y4 ou C	D
Argentina	N6	Q136	NA ¹	AF369926	AF369926	NA
Australia	Aus1	VMC71-238	AJ491110	AJ491132	AJ491255	AJ419272
Australia	Aus2	VMC71-238	AJ491111	NA	AJ491256	AJ491273
Brazil	BRA1	SP83-5073	AJ606086	AJ606086	AJ582772	AJ582790
Brazil	BRA2	RB83-5054	AJ621180	AJ621180	AJ582779	AM072623
<i>Brazil</i>	<i>BRA-YL3</i>	R570	NA	<i>This study</i>	NA	NA
Brazil	B1	SP71-6163	NA	AF369925	AF369925	NA
Brazil	maia	SP71-6163	NA	NA	AF141385	NA
<i>China</i>	<i>CHN-YL1b</i>	<i>CGT63-167</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>	<i>This study</i>	<i>NA</i>
China	CHN-FN96a	FN96-0907	NA	NA	DQ302757	NA
China	CHN-FN96b	FN96-0907	NA	NA	DQ392758	NA
Colombia	COL4	SP71-6163	NA	AM072624	AJ582778	AJ582789,
<i>Colombia</i>	<i>COL-YL2</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>NA</i>	<i>This study</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>
Colombia	C1	SP71-6163	NA	AF369927	AF369927	NA
Colombia	C4	CC84-75	NA	AF369929	AF369929	NA
Florida	USA1	TCP87-3388	NA	AM072631	NA	NA
Florida	USA2	CP85-1491	AJ621162	AM072632	AJ582780	AJ491260
<i>Guadeloupe</i>	<i>GLP-YL1a</i>	<i>R570</i>	<i>NA</i>	<i>This study</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>
<i>Guadeloupe</i>	<i>GLP-YL1b</i>	<i>R570</i>	<i>NA</i>	<i>This study</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>
<i>Guadeloupe</i>	<i>GLP-YL2</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>NA</i>	<i>This study</i>	<i>NA</i>	<i>NA</i>
Guatemala	G2	CP92-1654	NA	AF369924	AF369924	NA
Louisiana	L1	LHo83-153	NA	AF369923	AF369923	NA
Malaysia	MYS1	TC4	AJ606084	AJ606084	AJ582766	NA
Martinique	MTQ1	FR91485	NA	AM072626	NA	NA
Mauritius	Maur1	M1658-78	NA	NA	NA	AJ491280
Mauritius	Maur2	M2350-79	NA	NA	NA	AJ491281
Mauritius	MUS1	M99/48	AJ606085	AJ606085	AJ582764	NA
Peru	PER1	H32-8560	AJ621179	AM072627	AJ582767	NA

Philippines	PHL1	VMC76-16	NA	AM072628	AJ582761	NA
Réunion Island	REU0	R83-1592	NA	AM072629	NA	NA
Réunion Island	REU28	R490	NA	AM072641	NA	NA
Réunion Island	REU29	R81-0834	AJ621160	AM072642	AJ582771	NA
Réunion Island	REU31	AY7	AJ621171	AM072644	AJ582781	AJ582788
Réunion Island	REU32	R579	AJ606091	AJ606091	NA	NA
Réunion Island	REU33	R490	AJ621172	AM072645	NA	NA
Réunion Island	REU34	R570	AJ621173	AM072646	NA	NA
Réunion Island	REU37	R81-0834	NA	AM072648	AJ582775	NA
Réunion Island	REU38	R575	AJ621174	AM072649	NA	NA
Réunion Island	REU39	AY7	AJ621175	AM072650	NA	NA
Réunion Island	REU40	SP71-6163	AJ621177	AM072651	AJ582782	AJ582784
Réunion Island	REU41	R490	NA	AM072652	NA	NA
Réunion Island	REU42	SP71-6163	AJ621159	AM072653	AJ582762	AJ582792
Réunion Island	REU43	R575	NA	AM072654	NA	NA
Réunion Island	REU45	R579	NA	AM085305	AJ582774	NA
Réunion Island	REU46	S17	NA	AM072655	NA	NA
Réunion Island	REU47	R570	AJ621178	NA	NA	NA
Réunion Island	REU48	S17	NA	AM072656	NA	NA
<i>Réunion Island</i>	<i>REU-YL3</i>	<i>SP71-6163</i>	<i>This study</i>	<i>AM085306</i>	<i>This study</i>	<i>This study</i>
Réunion Island	REU1	R570	AJ621163	NA	NA	NA
Réunion Island	REU2	R577	AJ621166	NA	NA	AJ582785
Réunion Island	REU3	R577	AJ606090	NA	AJ582773	AJ582786
Réunion Island	REU4	R570	AJ621176	NA	AJ582776	NA
Réunion Island	REU21	R579	NA	AM072637	NA	NA
Réunion Island	REU25	R570	NA	NA	AJ582760	NA
Réunion Island	REU26	R575	AJ621169	AM072640	NA	NA
Réunion Island	REU30	R575	AJ621170	AM072643	NA	NA
Réunion Island	REU15	R579	AJ621165	AM072633	NA	NA
Réunion Island	REU17	R576	AJ606089	AJ606089	NA	NA
Réunion Island	REU18	R575	NA	AM072634	NA	NA
Réunion Island	REU19	R576	NA	AM072635	NA	NA
Réunion Island	REU20	R579	AJ621167	AM072636	NA	NA

Réunion Island	REU22	R570	AJ621168	AM072638	NA	NA
Réunion Island	REU24	R575	NA	AM072639	AJ582759	NA
Réunion Island	REU5	M1371/79	NA	NA	AJ582763	NA
Réunion Island	REU7	CP70-1133	AJ621161	NA	NA	NA
Réunion Island	REU9	R575	AJ606092	AJ606092	NA	NA
Réunion Island	REU11	R573	AJ621164	NA	NA	NA
Réunion Island	REU12	R569	AJ606087	AJ606087	AJ582765	AJ582791
Réunion Island	REU13	M1371/79	AJ606088	AJ606088	AJ582769	AJ582783
Réunion Island	REU35	R577	NA	AM072647	NA	AJ582787
Senegal	SEN1	NA63-90	NA	NA	AJ582768	NA
South Africa	SA1	N30	SYE491126	SYE491143	SYE491267	SYE491284
Sri-Lanka	LKA1	SLC9225	NA	AM072625	NA	NA
Taiwan	Taiw1	ROC11	AJ491127	AJ491144	AJ491268	AJ491285
Taiwan	Taiw2	ROC12	NA	NA	NA	AJ491286
USA	CPam1	CP65-357	NA	NA	AJ491271	SYE491288
USA	CPaus1	CP65-357	AJ491229	AJ491246	AJ491270	AJ491287
USA-Hawaii	Haw1	H87-4094	NA	NA	NA	AJ491278
USA-Hawaii	Haw2	H78-3606	NA	NA	NA	AJ491279

631 ¹ NA, not available, * Isolates in italics were amplified and sequenced in this study.

632

633 **Supplementary table 2**634 **SCYLV selection positive codons in ORFs 0, 1, 2, and 5 detected by the NEB and BEB calculations of CODEML in PAML (Yang 1997)**

ORF0			
Codon	Model ^a	p ^b	w ^b
96	M3	0.996	1.638
99	M3	0.997	2.333
114	M3	0.999	4.190
124	M3	0.987	2.000
136	M3	0.984	1.747
143	M3	0.976	1.190
		0.977 -	
145*	M2, M3, M8	1.000	5.197 - 5.968
148	M3	0.985	1.857
155	M3	0.962	2.386
181	M3	0.996	1.730
212	M3	0.996	1.489
		0.968 -	
228*	M2, M3, M8	1.000	5.161 - 5.853
233	M3	0.967	1.234
243	M3	0.996	1.847
253	M3	0.979	1.249
261	M3	0.966	1.121
		0.996 -	
271*	M2, M3, M8	1.000	5.231 - 6.104
		0.997 -	
274*	M2, M3, M8	1.000	5.232 - 6.117
275	M3	0.981	1.514
278	M3	0.983	1.798

ORF2			
Codon	Model ^a	p ^b	w ^b
579*	M3, M8	0.962	1.847
621*	M2, M3, M8	0.977 - 1.000	1.987 - 2.460
625*	M3, M8	0.978 - 0.982	1.882 - 1.949
639*	M3, M8	0.995 - 0.996	1.905 - 1.979
640*	M3, M8	0.982 - 0.985	1.888 - 1.955
744*	M3, M8	0.982 - 0.986	1.886 - 1.955
751*	M3, M8	0.986 - 0.988	1.892 - 1.962
810*	M3, M8	0.998	1.910 - 1.984
813*	M3, M8	0.997	1.908 - 1.982
844*	M3, M8	0.960 - 0.967	1.856 - 1.916

ORF5			
Nucleotide	Model ^a	p ^b	w ^b
1671	M8	0.982	1.645
1676	M8	0.981	1.644
1748	M8	0.982	1.645
1775*	M3, M8	0.952 - 0.999	1.670 - 2.289
1872	M8	0.991	1.657

ORF1			
Codon	Model ^a	p ^b	w ^b
93	M8	0.958 - 0.972	3.301 - 3.815
	M2, M3		
145*	M8	0.953 - 0.991	3.350 - 4.085
	M2, M3		
274*	M8	0.998 - 1.000	3.370 - 4.855
283	M8	0.952 - 0.968	3.291 - 3.793
550*	M3, M8	0.961 - 0.977	3.316 - 4.002
	M2, M3		
569*	M8	1.000	3.371 - 4.136
638*	M3, M8	0.953 - 1.000	4.594 - 5.594
653	M3	0.995	2.638
656	M3	0.994	2.351
664	M3	0.987	2.193
667	M3	0.995	2.550
671	M3	1.000	3.602
675	M3	0.995	2.54
	M2, M3		4.816 -
678*	M8	0.999 - 1.000	12.099
680	M3	0.995	2.414
683	M3	0.994	2.392
684	M3	0.992	2.271
686	M3	0.993	2.317
690	M3	0.993	2.259
700	M3	0.999	2.261
706*	M2, M8	0.967 - 1.000	3.894 - 4.646
720*	M2, M8	0.963 - 1.000	4.650 - 6.938
	M2, M3		
724*	M8	0.973 - 1.000	4.766 - 8.217
727	M3	0.999	2.259
729	M3	0.996	3.250

635 ^a : Model assuming a positive selection with class ω significantly better than their alternative models are given here.

636 ^b : Range of p-values and ω value taken from the different statistically significantly models.

637 * positive selection codons identified by at least two model calculating are indicated in bold.

Figure legends

FIG. 1. Schematic representation of genome organization of *Sugarcane yellow leaf virus*, location of fragments amplified by RT-PCR and location of positive selection codons. Grey rectangles indicate the open reading frames (ORFs 0 - 5) predicted for SCYLV RNA. Gene products are indicated above or below each ORF (CP = coat protein, MP = movement protein, and RTD = readthrough domain). White rectangles represent the four principal recombination regions (I-IV) identified in the genome. Flagged stars indicate the position of positive selection codons, and the longest flagged stars are the positive selection codons identified by at least two models. Thick grey bars at figure bottom are RT-PCR amplified fragments. The number of sequences available for each fragment is indicated above each thick grey bar.

FIG. 2. Neighbor-Joining tree of complete translated genome nucleotide sequences (ORFs 0-5, 5606-5612 bp) of 14 SCYLV isolates. Bootstrap values are displayed at nodes (from 1000 bootstrap re-samplings). Scale bar units are in number of substitutions per nucleotide.

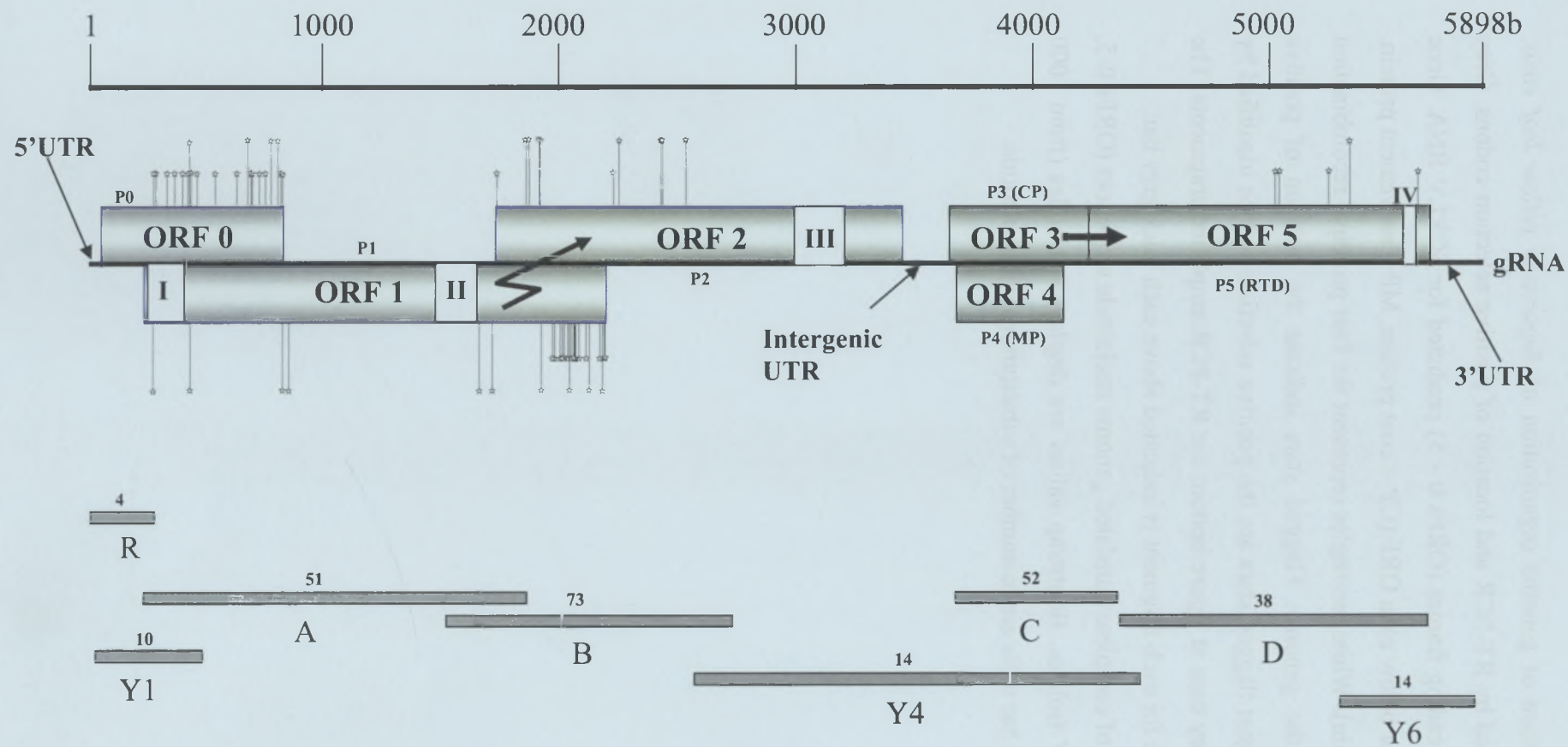
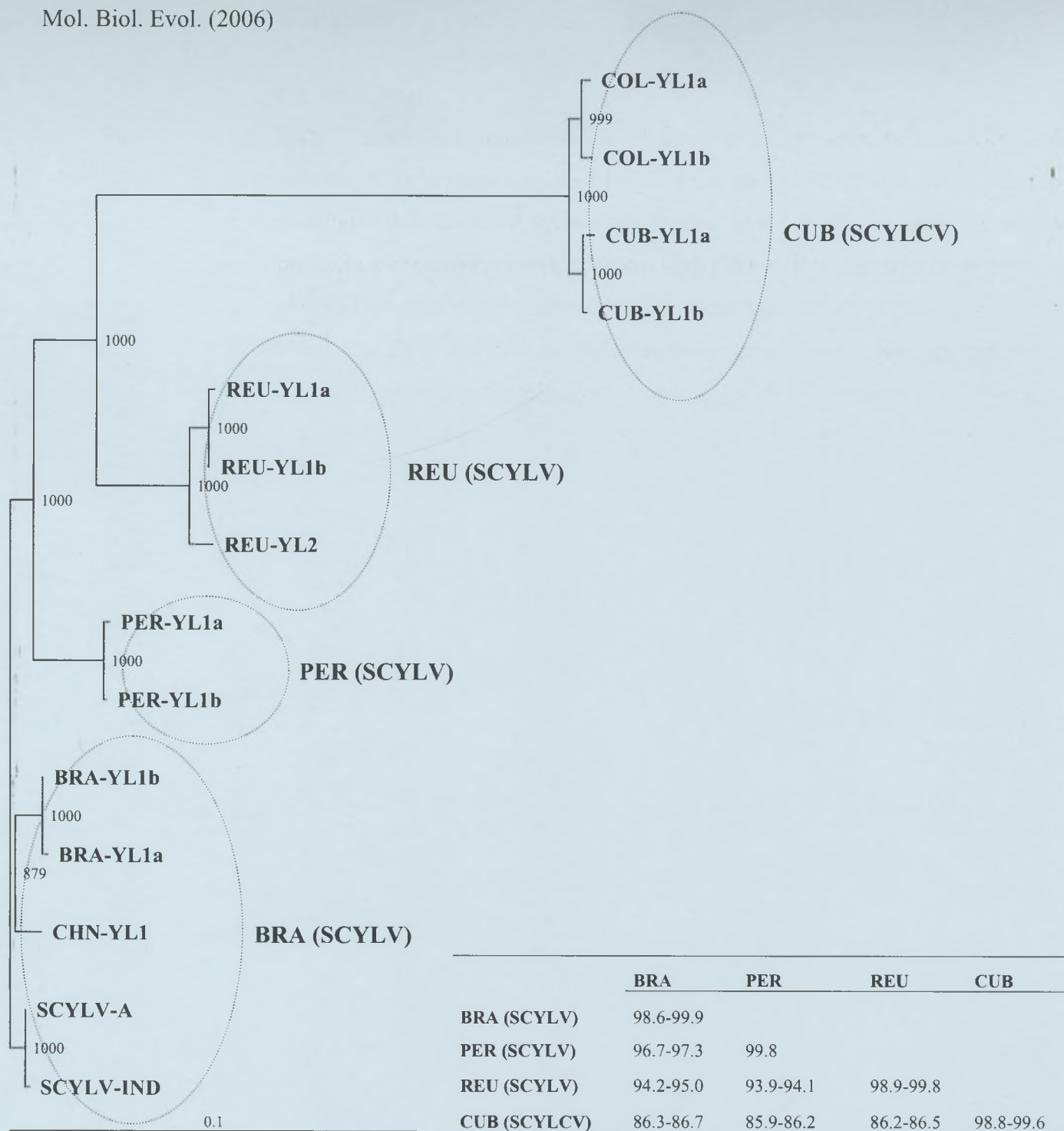


Fig. 1.



% of identity within and among clusters

Fig. 2.

CHAPITRE IV
CARACTERISATION DE LA VARIABILITE DU POUVOIR
PATHOGENE DU SCYLV

Résumé

Comme démontré dans les chapitres II et III, le SCYLV est un virus variable. Quatre génotypes viraux ont été identifiés à l'échelle mondiale et différents événements évolutifs ont eu lieu au cours de l'évolution du SCYLV. Cette variabilité suggère l'existence d'une variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV et nous avons essayé de valider cette hypothèse en utilisant deux méthodes différentes :

1/ Comparaison de plantes naturellement infectées au champ : deux variétés de canne à sucre (R570 et SP71-6163) infectées par des isolats du SCYLV originaires de différentes zones géographiques (Afrique du sud, Brésil, Colombie, Floride, Guadeloupe, Hawaii, Maurice et La Réunion) ont été importées sous forme de boutures à Montpellier. Ce matériel végétal a été utilisé pour mettre en place un essai comparatif en serre, sous forme d'un dispositif en blocs à 10 répétitions d'une plante de canne à sucre chacune. Cet essai a été répété une fois par an et pendant trois ans (2003-2005). Après trois mois de croissance en serre, les plantes ont été régulièrement inspectées (une fois par semaine) et l'évolution des symptômes de la maladie de la feuille jaune a été notée sur une échelle de 0 à 5.

Différents paramètres ont été mesurés après 6 mois de croissance des plantes en serre : nombre de tiges infectées ; taille de la tige principale et nombre d'entre-nœuds ; % de surface de tubes criblés infectés par le SCYLV dans les feuilles F1 à F4 de la tige principale et dans la feuille F1 d'un talle et dans la tige ; densité virale dans la feuille F1. Les analyses statistiques ont permis de montrer que le comportement du SCYLV peut varier dans une canne à sucre en fonction de son aire de culture d'origine, suggérant l'existence de souches de SCYLV à pathogénie différente. Les différences entre souches virales ne sont cependant pas toujours reproductibles d'une année à l'autre, probablement à cause d'un effet important des conditions environnementales (climat, ..)

2/ Comparaison de plantes inoculées en conditions contrôlées : huit variétés de canne à sucre ayant différents niveaux de résistance au SCYLV ont été multipliées à Montpellier et envoyées en Guadeloupe et à l'île de La Réunion sous forme de vitroplants. Ces vitroplants ont été inoculés sur place par différents génotypes du SCYLV (BRA, CUB et REU en Guadeloupe et BRA et REU à La Réunion) via *Melanaphis sacchari*. L'ensemble des vitroplants inoculés a été rapporté et sevré à Montpellier afin de déterminer l'efficacité de transmission des différents génotypes de SCYLV via *M. sacchari*. Le virus a été détecté par

TBIA et RT-PCR dans les plantes en provenance des deux sites géographiques cinq et six mois après le transfert des plantes en serre. L'efficacité de transmission du virus a varié en fonction des variétés de canne à sucre et des géotypes du SCYLV. Les géotypes BRA-PER et CUB ont été transmis aux 8 cultivars, mais le géotype REU n'a jamais été détecté après inoculation dans les variétés résistantes H78-4153 et H78-3567. Le géotype REU a été transmis à la variété R570 en Guadeloupe, mais pas à la Réunion. Les géotypes BRA-PER et CUB ont provoqué le développement de symptômes de jaunissement chez les variétés de canne à sucre sensibles à la feuille jaune. En revanche, le géotype REU en a provoqué très peu. Ces résultats permettent de démontrer pour la première fois l'existence de différentes souches de SCYLV.

INTRODUCTION

L'évolution des agents pathogènes présente un paradoxe. En effet, les espèces pathogènes sont absolument dépendantes de leur hôte pour leur propagation mais le principe de vie de l'agent pathogène exige que l'hôte soit endommagé au cours de cette dépendance (Brown *et al.*, 2006). Les stratégies de pathogénie ont du succès en termes évolutifs parce qu'une gamme diverse d'agents pathogènes existe dans la nature. Ces derniers évoluent également en utilisant une large gamme de mécanismes moléculaires pour acquérir et moduler des traits existants de virulence afin de réaliser ce succès (Brown *et al.*, 2006).

La variabilité est un facteur clé pour le pouvoir pathogène des virus à ARN chez lesquels l'adaptation aux situations changeantes doit conserver de la robustesse génétique et maintenir de la valeur adaptative (*fitness*), malgré la présence de mutations dans le génome (Drake & Holland, 1999 ; Elena, 2002 ; Garcia-Arenal *et al.*, 2003). Les virus sont sujets aux effets nuisibles des mutations, mais ils peuvent aussi s'adapter plus rapidement aux situations changeantes (Sanjuan *et al.*, 2004a et b). Cependant, la variabilité est formée par la réplication du génome et les stratégies d'expression, de même que par les interactions virus-vecteur et virus-hôte qui imposent les pressions de sélection et qui représentent aussi des facteurs clés pour le pouvoir pathogène (Garcia-Arenal *et al.*, 2003).

Comme nous l'avons mentionné dans le deuxième chapitre de cette thèse, il existe un taux élevé de mutations chez les virus à ARN. Ces virus devraient donc être très diversifiés dans leur milieu naturel car ce potentiel de variabilité leur permet de s'adapter rapidement à des changements environnementaux. Ainsi, pour de nombreux phytovirus, une différenciation des populations virales en fonction de leur origine géographique a été montrée par des analyses phylogénétiques (Bousalem *et al.*, 2000 ; García-Arenal *et al.*, 2001 ; Abubakar *et al.*, 2003). En revanche, une telle structuration n'est pas observée chez tous les virus des plantes. Par exemple, les populations du *Citrus tristeza virus* ou CTV (*Closterovirus*) sont très homogènes à l'échelle mondiale (Albiach-Martí *et al.*, 2000). Cette faible diversité et la stabilité génétique du virus est mise en parallèle avec le fait que la plante hôte est une plante pérenne multipliée principalement par greffage (voie végétative), et que de nombreux pays ont importé des greffons venant d'une source commune. Généralement, il est probable que l'homogénéisation des populations virales soit favorisée par les échanges intercontinentaux de matériel végétal contaminé et/ou lorsque les plantes hôtes sont pérennes ou à multiplication végétative (García-Arenal *et al.*, 2001). Cependant, il a été montré très récemment que les populations du *Plum pox virus* ou PPV (*Potyvirus*), agent responsable de la maladie de la

Sharka, étaient très différentes et qu'elles évoluent de façon indépendante à l'intérieur d'un arbre fruitier (Jridi *et al.*, 2006).

La transmission des phytovirus par insectes vecteurs joue un rôle crucial dans la structuration des populations de ces virus. Par exemple, l'efficacité de transmission d'un virus local par une population locale de *Bemisia tabaci* est dix fois plus élevée que celle d'un virus provenant d'une autre région (Maruthi *et al.*, 2002). Si les maladies provoquées par les virus sont le plus souvent à l'origine de leur découverte, il ne faut pas en conclure que tous les virus induisent un état pathologique chez leur hôte. Il semble au contraire que le virus, pour se multiplier et être transmis à d'autres hôtes, peut "avoir intérêt", à ménager la santé de son hôte. La virulence ou l'agressivité est un caractère soumis à la sélection et notamment quand il est corrélé à des performances reproductives supérieures. La sélection avantagerait le maximum de multiplication et de transmission plutôt que l'état de maladie et la mort de l'hôte (Astier *et al.*, 2001).

1. TRANSMISSION ET INTERACTIONS VIRUS/VECTEUR

Les virus de la famille des *Luteoviridae*, y compris le SCYLV, sont transmis par des pucerons selon le mode circulant persistant et non multipliant (transmission non-propagative) (Gray & Banergee, 1999; Brault *et al.*, 2001 ; Gray & Gildow, 2003). Le temps moyen minimal nécessaire à l'acquisition et à l'inoculation du virus est d'une heure pour chaque étape. Cependant, l'efficacité de la transmission (ET, proportion de plantes effectivement inoculées) est améliorée avec un temps d'acquisition augmentant jusqu'à 2 jours (Taliensky *et al.*, 2003). L'espèce, le clone, le biotype, le morphe et le stade larvaire de puceron, sont autant de facteurs qui peuvent moduler l'ET (Robert, 1999; Dedryver *et al.*, 2005). La température au cours du processus de transmission (Robert & Rouzé-Jouan, 1971) et l'isolat viral (Tamada *et al.*, 1984 ; Bourdin *et al.*, 1998) sont également déterminants.

Après la piqûre d'acquisition, il existe une période de latence (avec absence de transmission) à l'issue de laquelle l'insecte peut transmettre le virus en conservant son pouvoir vecteur pendant de longues périodes. Le vecteur reste généralement infectieux à vie après une première acquisition virale (James & Keith, 2004).

Les particules virales sont ingérées avec la sève lors de la prise du repas du puceron en piquant le phloème d'une plante virosée. Elles transitent et circulent ensuite dans l'intestin moyen de l'insecte dont elles traversent les cellules pour atteindre la cavité générale (hémolymph). Elles diffusent dans l'hémolymph puis atteignent les glandes salivaires

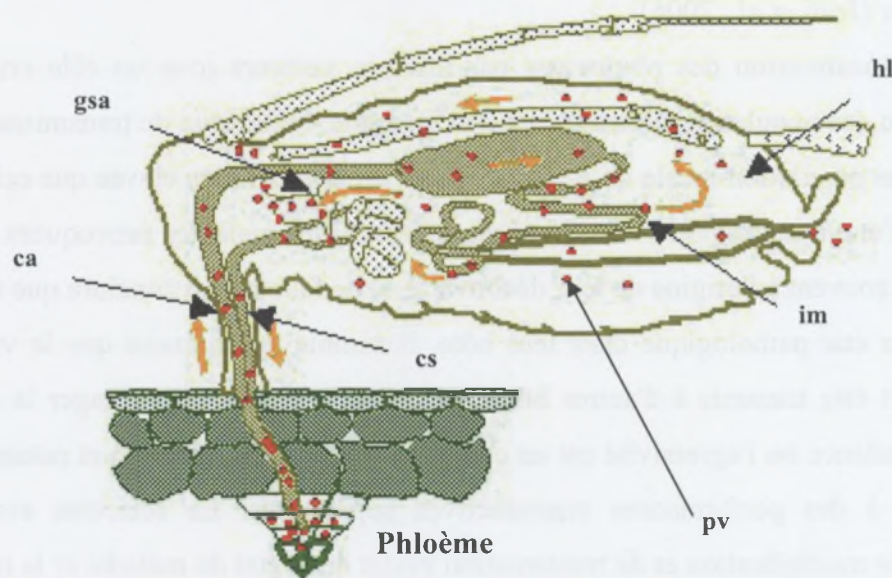


Figure 23 : Trajet des particules virales du PLRV ou du BWYV (*Potomovirus*) dans le puceron vecteur (d'après Robert & Bourdin, 2001). Les particules virales (pv) sont ingérées par le canal alimentaire (ca) lors d'une prise de nourriture. Elles pénètrent dans l'hémolymphe (hl) au travers de l'épithélium de l'intestin moyen (im). Elles diffusent jusqu'aux glandes salivaires accessoires (gsa) dont elles traversent la membrane, gagnent le canal salivaire (cs) et sont inoculées dans un nouvel hôte lors d'une prise de nourriture ultérieure par le puceron.

accessoires dont elles traversent également les cellules pour être libérées dans le tube digestif de l'insecte. Elles sont reconnues par des récepteurs localisés sur la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin moyen ou de l'intestin postérieur, selon les virus. Cette reconnaissance spécifique est suivie de l'internalisation des virions dans des vésicules à couverture de clathrine (Brault *et al.*, 2001). Ces vésicules migrent ensuite jusqu'à la membrane basale des cellules épithéliales avec laquelle elles fusionnent, libérant ainsi les virions dans l'hémolymphe où les virus interagissent avec une protéine bactérienne (Figures 23 et 24). Cette protéine appelée la symbionine est une protéine chaperone de type GroEL produite par les bactéries endosymbiontes primaires (genre *Buchnera*) des pucerons et présente en abondance dans l'hémolymphe (van den Heuvel *et al.*, 1994; Gonçalves *et al.*, 2005a). La symbionine n'est cependant pas un facteur de la spécificité vectrice, car elle est présente chez de nombreuses espèces, vectrices ou non (Brault *et al.*, 2001).

La protéine de translecture (RT) du *Potato leafroll virus* (PLRV) et du *Beet western yellows virus* (BWYV) se lie à la symbionine, et cette interaction maintiendrait l'intégrité de la particule virale dans l'hémolymphe. En effet, des études ont montré que l'hémolymphe est un environnement hostile aux agents pathogènes jouant un rôle actif dans les mécanismes de défense. Cependant, les virus de la famille des *Luteoviridae* ont développé un mécanisme pour contourner cette défense immunitaire. Les particules virales migrent ensuite jusqu'à niveau des glandes salivaires accessoires (GSA). A ce niveau, elles traversent la lamelle basale, puis elles sont internalisées dans des vésicules d'endocytose (Figures 23 et 24) grâce à une reconnaissance virus/récepteurs membranaires (Garret *et al.*, 1993 ; Gildow, 1993 ; Gildow & Gray, 1993 ; Peiffer *et al.*, 1997). Ces vésicules migrent jusqu'au pôle apical des cellules glandulaires et fusionnent avec la membrane plasmique, libérant ainsi les particules virales dans la salive de l'insecte. Cette salive virulifère sera ensuite libérée dans le phloème d'une plante saine lors d'une prise de nourriture.

Trois barrières principales traversées par les *Luteoviridae* ont été identifiées dans le puceron : la membrane apicale des cellules intestinales, la lamelle basale et la membrane basale des cellules des GSA. Les *Luteoviridae* sont transmis par leur vecteur de manière très spécifique, et chaque espèce virale est transmise efficacement par seulement une ou deux espèces de pucerons. Le degré de spécificité élevé dépend des interactions qui peuvent s'établir entre les protéines virales et les récepteurs membranaires potentiels situés dans le corps du puceron. Le rôle de la capside virale dans la spécificité vectrice a été élucidé grâce aux travaux de Rochow sur la transcapsidation entre différents virus de cette famille (Rochow, 1977). Ainsi, la co-infection d'une même plante par deux virus proches conduit à la

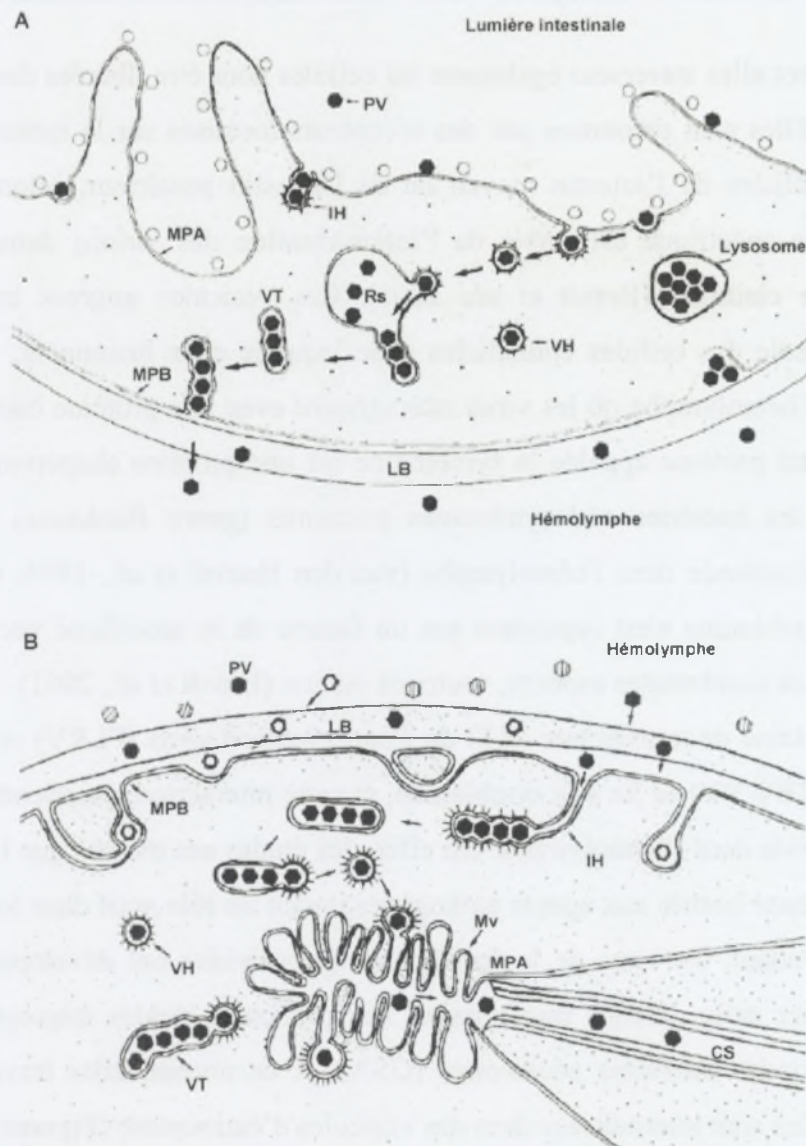


Figure 24 : Modèle de transport intracellulaire des particules du PLRV (modifié d'après Gildow, 1999). A : passage au travers de l'épithélium intestinal ; les particules virales (PV) s'attachent à la membrane plasmique apicale (MPA) qui forme des invaginations hérissées (IH) d'où bourgeonnent des vésicules hérissées (VH) qui s'assemblent en réceptosomes (Rs). De là, des vésicules tubulaires (VT) non hérissées transportent le virus jusqu'à la membrane plasmique basale (MPB) avec laquelle elles fusionnent pour libérer les particules virales. Celles-ci diffusent au travers de la lamelle basale (LB) et gagnent l'hémolymphe. B : passage au travers de l'épithélium des glandes salivaires ; le trajet intra cellulaire est proche de celui accompli dans l'épithélium intestinal ; les vésicules de transport des particules formées au niveau de la membrane plasmique basale fusionnent avec la membrane apicale (MPA) au niveau de microvillosités (Mv) et libèrent les particules dans le canal salivaire (CS).

formation de particules hybrides composées de l'ARN d'un virus et de la capside de l'autre virus ; dans ce cas, la spécificité de transmission est déterminée par la nature de la capside de ces particules hybrides.

D'autres interactions moléculaires fines entre composantes virales et composantes du puceron interviennent aussi dans la transmission aphidienne des virus de la famille des *Luteoviridae*. Ainsi, les protéines constitutives de la capside (CP) et le domaine de translecture (RTD) interagissent directement avec les récepteurs potentiels des pucerons, et ils ont un rôle crucial dans la vection (Brault *et al.*, 2000, Brault *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005b). Une étude de mutagenèse ciblée avec le BWYV a montré la localisation des domaines peptidiques nécessaires à la transmission dans la partie centrale de la protéine mineure de la capside qui est très conservée chez les *Luteoviridae*. Par ailleurs, le changement d'un seul acide aminé dans la partie variable de la protéine de translecture (RT) du PLRV a aussi entraîné une réduction très importante du taux de transmission de ce virus (Jolly & Mayo, 1994). Une co-acquisition de PLRV purifié et d'anticorps monoclonaux dirigés contre la CP de ce virus a conduit à une inhibition de la transmission (Van den Heuvel *et al.*, 1993). La CP possède donc également des déterminants essentiels pour la transmission. Enfin, Rouzé-Jouan *et al.* (2001) ont montré qu'une souche de PLRV faiblement transmise par *Myzus persicae* ne traverse que peu ou pas la membrane intestinale et présente des différences en acides aminés dans la CP et le RTD par rapport aux souches bien transmises.

De plus, Brault *et al.* (2003) ont montré que l'introduction de mutations dans la région N-terminale du RTD du BWYV bloque le passage de la membrane intestinale chez *M. persicae* et affecte la transmission du virus par le puceron. Toutefois, Chay *et al.* (1996b) ont observé qu'un mutant du *Barley yellow dwarf virus*-serotype PAV (BYDV-PAV) dépourvu de RTD est capable de traverser la membrane intestinale du vecteur pour se retrouver dans l'hémolymphe, mais ce mutant ne peut pas traverser la membrane des glandes salivaires.

2. DIVERSITE DU POUVOIR PATHOGENE CHEZ LES LUTEOVIRIDAE

Des diversités biologiques et moléculaires ont été mises en évidence chez plusieurs virus de la famille des *Luteoviridae*. Chez le BYDV-PAV, des différences d'agressivité observées à l'égard de plusieurs espèces hôtes ont été associées à des différences au niveau de la séquence de la CP (Bencharki *et al.*, 1999) et d'autres régions du bloc de gènes situé en 3' (Mastari et Lapierre, 1999). Le *Soybean dwarf virus* (SbDV) est subdivisé en quatre souches (YS, YP, DS et DP) qui se différencient par leur pouvoir pathogène et leur puceron vecteur : les souches YS et YP causent un jaunissement chez le soja et infectent le trèfle blanc

(*Trifolium repens* L.), les souches DS et DP causent un nanisme chez le soja et infectent le trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.) ; tandis que les souches YS et DS sont transmises par *Aulacorthum solani*, les souches YP et DP sont transmises par *Acyrtosiphon pisum* (Terauchi *et al.*, 2001). L'analyse de séquences complètes d'isolats appartenant à ces quatre souches a montré que l'ensemble du génome est en corrélation avec le pathotype, à l'exception de la séquence de la moitié N-terminale du domaine de translecture RTD permettant de distinguer des différences de spécificité de vecteur entre les isolats d'un même pathotype.

Par ailleurs, des études effectuées sur les *Polerovirus* des *Brassicaceae*, entre lesquels les relations ont longtemps été confuses, ont aussi permis de montrer une corrélation très significative entre les séquences de la protéine P0 codée par l'ORF 0 et la gamme d'hôtes, ce qui a conduit les chercheurs à proposer la suppression de la dénomination du BWYV et la création de trois espèces distinctes basées sur ces critères : *Beet mild yellowing virus* (BMV), *Brassica yellowing virus* (BrYV) et *Beet chlorosis virus* (BChV) (Hauser *et al.*, 2000). Toutefois, l'analyse des séquences de la protéine de capsid de ces espèces n'a pas permis de montrer de structuration significative. Le pourcentage d'homologie minimale dans cette région était seulement de 90% environ, ce qui était supérieur aux valeurs obtenues pour le BYDV-PAV (82.6% ; Bencharki *et al.*, 1999) et le SbDV (85% ; Terauchi *et al.*, 2001).

Il existe un lien entre le pouvoir pathogène (ou la virulence) et la transmission des phytovirus, et ce lien a été le sujet de recherche de nombreuses équipes. Ewald (1987) a suggéré que le mode de transmission (vertical ou horizontal) affecte l'évolution du pouvoir pathogène. Selon ses hypothèses, les agents pathogènes transmis verticalement doivent évoluer vers un pouvoir pathogène plus faible, car leur propre succès dépend du succès de l'hôte (les valeurs adaptatives sont positivement corrélées). Inversement, les agents pathogènes transmis horizontalement peuvent maintenir un pouvoir pathogène élevé car leur survie n'est pas aussi limitée par la descendance de l'hôte. Ces hypothèses ont été vérifiées par Clayton et Tompkins (1994) et Herre (1993). Il a été montré, pour les agents pathogènes transmis horizontalement, que la corrélation positive entre le taux de transmission et le pouvoir pathogène était expliquée par la corrélation entre la densité intra-hôte de l'agent pathogène et son pouvoir pathogène (Fenner, 1956 ; Mackinnon & Read, 1999). Ainsi, l'augmentation du pouvoir pathogène, en général due à l'accroissement du taux de multiplication, entraîne une augmentation de la concentration de l'agent pathogène dans son hôte, et accroît ainsi la probabilité de transmission.

Le rythme de transmission du PLRV par pucerons a aussi un impact sur son évolution. En effet, ce phénomène peut expliquer l'augmentation de l'efficacité de transmission (ET) au cours des "passages longs", hypothèse accréditée par l'observation d'une sélection positive sur la protéase impliquée dans la réplication du virus (Guyader, 2003).

Une variabilité biologique importante a été observée chez le PLRV qui peut provoquer des symptômes très faibles à très sévères selon les isolats du virus. De plus, l'efficacité de transmission pour une souche virale donnée peut varier de 0 à 70% selon le clone de puceron utilisé (cas de la souche 14.2 chez le PLRV) (Guyader, 2003). A l'inverse, un même clone de puceron peut transmettre des isolats viraux distincts avec une efficacité différente (Bourdin *et al.*, 1998). La comparaison de séquences nucléotidiques complètes du PLRV a permis de montrer que la plupart des souches ne diffèrent entre elles que de 2% en moyenne, malgré leurs origines géographiques très diverses et le PLRV est donc un virus peu variable d'un point de vue génétique (Guyader, 2003). La variabilité des propriétés biologiques du PLRV est donc liée à de faibles variations au niveau du génome.

2.1. Objectifs de l'étude

Dans le chapitre II, nous avons montré que le génome du SCYLV est variable et qu'il existe chez ce virus au moins quatre génotypes. Les séquences nucléotidiques de ces génotypes diffèrent entre elles d'au moins 5% en moyenne. Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse que cette variabilité importante au niveau moléculaire est peut-être aussi liée à une diversité du pouvoir pathogène du virus. Le but de notre étude est de vérifier cette hypothèse et deux approches complémentaires ont été réalisées :

- 1/ Comparaison de plants de canne à sucre naturellement infectés au champ par le SCYLV dans différents pays.
- 2/ Comparaison de plants de canne à sucre inoculés par différents génotypes de SCYLV en condition contrôlées.

Ces travaux sont présentés ci-après sous la forme de deux articles : L'article 4 a été soumis à la revue *Plant Pathology* et l'article 5 a été accepté dans la revue *Plant Disease*.

2.2. Variation des populations virales et caractéristiques de croissance de deux variétés de canne à sucre naturellement infectées par le Sugarcane yellow leaf virus dans différentes zones géographiques

Article 4

Y. Abu Ahmad, J.-C. Girard, E. Fernandez, J. Pauquet, B.E.L. Lockhart, P. Letourmy and P. Rott. 2006. Variation in virus population and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by *Sugarcane yellow leaf virus* in different geographical locations. Plant Pathology (Soumis).

Short title: SCYLV populations in two sugarcane cultivars

Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by *Sugarcane yellow leaf virus* in different geographical locations

Y. Abu Ahmad^a, J.-C. Girard^a, E. Fernandez^a, J. Pauquet^b, B.E.L. Lockhart^c, P. Letourmy^d and P. Rott^{a*}

^aUMR Agro.M-Cirad-Inra Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI), Campus International de Baillarguet, TA 41/K, Montpellier Cedex 5, F-34398 France; ^bUMR Agro.M-Cirad-Inra Polymorphismes d'Intérêt Agronomique (PIA), Montpellier, F-34000, France; ^cDepartment of Plant Pathology, University of Minnesota, St Paul, MN 55108, USA; ^dCirad, UPR Aide à la Décision et Biostatistique, Montpellier, F-34000, France.

* E-mail: philippe.rott@cirad.fr

For communication: Philippe Rott

Phone: 33 4 99 62 48 34

Fax: 33 4 99 62 48 48

E-mail: philippe.rott@cirad.fr

Two sugarcane cultivars (R570 and SP71-6163) naturally infected by *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) were each imported from several geographical locations into a sugarcane yellow leaf-free environment (Montpellier/France). Plants were grown for 5-6 months and three consecutive years (2003-2005) in a greenhouse, and several sugarcane growth and disease characteristics were monitored to identify variation in pathogenicity of SCYLV. Depending on their geographical origin, sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 were infected by SCYLV genotypes BRA-PER or REU, or a mixture of the two genotypes. Severity of symptoms did not vary between plants of cultivar R570, but variation in disease severity between plants of cultivar SP71-6163 from different geographical locations suggested the occurrence of pathogenic variants of SCYLV. For each sugarcane cultivar, differences in stalk length, number of stalk internodes, virus titre in the top visible dewlap leaf, and percentage of infection of leaf and stalk phloem vessels were also found between plants from different geographical origins. These differences were, however, not always reproducible from one growth cycle to another, suggesting an effect of environmental conditions on disease progress or evolution of SCYLV populations in sugarcane.

Keywords: DAS-ELISA, *Luteoviridae*, *Polerovirus*, RT-PCR, TBIA, virus genotype.

Introduction

Association of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) with yellowing of sugarcane leaves has been reported in numerous sugarcane-producing countries worldwide (Borth *et al.*, 1994; Comstock *et al.*, 1994; Vega *et al.*, 1997; Lockhart & Cronjé, 2000; Schenck, 2001; Viswanathan, 2002; Rassaby *et al.*, 2004). Symptoms consist of an intense yellowing on the abaxial surface of the midrib in mature leaves. The lamina is often still green, but gradually the yellow colour spreads laterally into it, starting at the tip and progressing towards the base of the leaf. A pinkish coloration of the midrib can sometimes be observed on its adaxial surface. Symptoms also include shortening of terminal internodes and necrosis of older leaves starting from the leaf tip. However, most of these symptoms may be related to other biotic or abiotic factors of stress conditions, particularly following cold weather, but also drought, water logging, aberrant climatic patterns or nutrient deficiency (Comstock *et al.*, 1994; Lockhart *et al.*, 1996; Mastuoka & Meneghin, 1999; Schenck, 2001; Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2002). An association of yellowing symptoms in sugarcane with a phytoplasma called

sugarcane yellows phytoplasma (SCYP), sugarcane yellow leaf phytoplasma (SCYLP) or *Candidatus* Phytoplasma graminis has also be reported in several sugarcane producing countries including Cuba (Arocha *et al.*, 2005), Mauritius (Aljanabi *et al.*, 2001) and South Africa (Cronjé *et al.*, 1998). This phytoplasma seems, however, to be less widespread than SCYLV. The disease associated with SCYLV was recently named yellow leaf, whereas the disease associated with SCYP was named leaf yellows (Rott *et al.*, 2005). These new disease names replaced the name yellow leaf syndrome or YLS commonly found in the literature and that was associated with various origins including SCYLV and SCYP (Lockhart & Cronjé, 2000).

Besides the symptoms mentioned above, SCYLV also causes a lowered chlorophyll *a/b* ratio and smaller photosynthetic capacity, reduction in sucrose content in sugarcane stalks, and accumulation of sucrose in midribs (Lehrer *et al.*, 2001; Fontaniella *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2005). SCYLV is a pathogen of economic importance, and yield losses attributed to SCYLV in commercial sugarcane fields have been reported in several countries. In Brazil, sugarcane cultivar SP71-6163, that is highly susceptible to yellow leaf and that was grown over thousands of ha in the 1980s, suffered yield losses up to 20% (Vega *et al.*, 1997; Lockhart & Cronjé, 2000). Incidence of SCYLV varies from 0-100% (Viswanathan, 2002; Rassaby *et al.*, 2004), and yield reduction may occur even in asymptomatic plants (Vega *et al.*, 1997; Grisham *et al.*, 2002; Rassaby *et al.*, 2003). Hot water treatment of cuttings used to control several diseases of sugarcane is not effective in eliminating the virus from infected material (Chatenet *et al.*, 2001; Moutia & Saumtally, 2001; Comstock & Miller, 2004; Flynn *et al.*, 2005).

The genome of SCYLV has been entirely sequenced (Moonan *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000), and the virus has been recently assigned to the genus *Polerovirus* of the family *Luteoviridae* (D'Arcy & Domier, 2005). Several diagnostic techniques have been developed to detect the pathogen in infected plant material such as DAS-ELISA (Scagliusi & Lockhart, 2000), tissue blot immunoassay (TBIA) (Schenck *et al.*, 1997; Chatenet *et al.*, 2001; Korimbocus *et al.*, 2002b), reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Comstock *et al.*, 1998) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA) (Gonçalves *et al.*, 2002; Korimbocus *et al.*, 2002a). SCYLV, as other members of *Luteoviridae*, resides in the phloem tissue of plants and is propagated by infected sugarcane cuttings (Scagliusi & Lockhart, 2000; Schenck & Lehrer, 2000; Lehrer *et al.*, 2001). It has been successfully transmitted by several aphid species including *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* and *R. rufiabdominalis* (Scagliusi & Lockhart, 2000; Schenck & Lehrer, 2000).

Several genetic diversity studies showed that SCYLV is a variable virus (Borg *et al.*, 2001; Moonan & Mirkov, 2002; Abu Ahmad *et al.*, 2006a). Based on phylogenetic studies, four genotypes of the virus have been identified: BRA for Brazil, CUB for Cuba, PER for Peru and REU for Réunion Island. Genotypes BRA and PER are, however, phylogenetically relatively close and could not be differentiated by specific RT-PCR primers so far (Abu Ahmad *et al.*, 2006b). These two genotypes were therefore combined and called genotype BRA-PER. Only a single SCYLV genotype occurs in most sugarcane producing areas, and genotype BRA-PER was the most widespread in a survey that included 18 geographical locations worldwide. However, several genotypes of SCYLV were found in locations such as Brazil, Colombia, Guadeloupe and Réunion Island (Abu Ahmad *et al.*, 2006b). Recent studies showed that genotypes BRA-PER and REU are two different strains of SCYLV based on their capacity to infect specific sugarcane cultivars (Abu Ahmad *et al.*, unpublished). The objective of this study was to analyse differences between SCYLV isolates/genotypes that are all able to infect the same sugarcane cultivar. Sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV in five and three different geographical locations, respectively, were imported to Montpellier/France. Plants were grown for 5-6 months and three consecutive years (2003-2005) in a greenhouse, and several sugarcane growth and disease characteristics were monitored to identify variation in pathogenicity of SCYLV.

Materials and methods

Sugarcane plants and experimental design

SCYLV-infected cuttings of sugarcane cultivars R570 (tolerant to yellow leaf; Rassaby *et al.*, 2003) and SP71-6163 (highly susceptible to yellow leaf; Lockhart & Cronjé, 2000) were imported to Montpellier/France from different geographical locations (Table 1). SCYLV-free sugarcane cuttings were imported from Guadeloupe (cultivar SP71-6163), Réunion Island (cultivar R570) and South Africa (cultivar SP71-6163), and used as controls. Upon import and passage through Cirad's European sugarcane quarantine, cuttings were planted in pots in a greenhouse, and the resulting stalks were used to establish the first two greenhouse trials. At the beginning of each trial, cuttings were germinated in a climate-controlled room at 28-30°C, and the young shoots were planted in 7.5-litre pots containing a mixture of peat moss, compost and volcanic rock (2/5:2/5:1/5, v/v/v). Plants were then transferred to the greenhouse (12 x 7 x 3 m), drip watered and grown for six months in a total randomised block design with

10 replications of one plant. Each sugarcane plant consisted of the primary stalk and a tiller. During plant growth, additional tillers were regularly removed from the pot to favour growth of the main stalk. The experiment was repeated for three years (2003-2005), and consisted each year of a duplicated trial in two separate greenhouses. Plants were grown in the greenhouse for 5-6 months and, at the end of each group of two trials, 4-5 of 20 plants were transferred to a glasshouse to store plants until the set up of the next group of trials. Consequently, stalks from the 2003 trials were used to produce the cuttings of the 2004 trials, and stalks from the 2004 trials were used to produce the cuttings of the 2005 trials. Because cuttings of SCYLV-infected cultivar R570 from Brazil and Mauritius and SCYLV-free cuttings of cultivars R570 and SP71-61263 arrived in Montpellier after the beginning of the experiment, these plants were not tested for the entire duration of the experiment (Tables 1-6).

Sugarcane DNA fingerprinting

Identity of each sugarcane cultivar from each location was verified by fingerprinting using Simple Sequence Repeat (SSR) markers. DNA was extracted from fresh leaves of a single plant with the MATAB standard extraction protocol (Risterucci *et al.*, 2000). All plants were analysed with three SSRs (mSSCIR4, mSSCIR12 and mSSCIR32) developed at CIRAD in collaboration with Génoscope (Evry, France) from an enriched library build with sugarcane cultivar R570 (Rossi *et al.*, 2003; <http://tropgenedb.cirad.fr/en/sugarcane.html>). DNA amplification was performed as follows. Primers were end-labelled with [γ -³³P]ATP and SSR amplification was carried out in a total volume of 20 μ l containing 25ng of DNA, 0.2mM of each dNTP, 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), each primer at 0.4 μ M, and 1 U of Taq polymerase (MP Biomedicals, Strasbourg, France). Samples were denaturated at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C and 45 sec at 72°C, and a final extension step for 10 min at 72°C. After the addition of 20 μ l of loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol), the amplified products were denaturated at 94°C for 3 min and left at 72°C before loading. Four microlitres of each sample were loaded onto a 5% polyacrylamide gel with 7.5 M urea and electrophoresed in 0.5% TBE buffer at 55W for 1h30. The gel was dried for 20 min at 80°C and exposed to CRT7 X-ray film (Ferrania S.p.A., Cairo Montenotte, Italy) for four days.

Detection of SCYLV and identification of SCYLV genotypes in sugarcane

Total RNA was extracted and purified from the top visible dewlap leaf and SCYLV was detected by RT-PCR with diagnostic primers YLS 462 and YLS111, as described by Abu

Ahmad *et al.* (2006a). Genotypes of SCYLV were determined as described by Abu Ahmad *et al.* (2006b). Virus genotyping was performed with three plants sampled from each sugarcane cultivar x origin combination in each of the six trials.

Rating of yellow leaf symptoms

Disease symptoms were recorded on all leaves of each stalk. A score ranging from 0 to 5 and corresponding to the severity of symptoms was assigned to each leaf: 0 = no symptoms, 1 = slight yellowing of the central part of the midrib, 2 = pale yellow colour all along the midrib, 3 = strong yellow colour all along the midrib, 4 = yellow coloured midrib and yellow or pink coloured lamina, 5 = severe yellowing and necrosis of lamina. Yellow leaf symptoms were recorded on three month-old plants and every week until the end of each trial. The highest score of each plant at each scoring date was used to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC) (Campbell and Madden, 1990). AUDPC and the last recorded score of each plant were used for data analyses.

Growth characteristics of sugarcane plants

At the end of the experiment, 5-6 month-old stalks were cut by hand at soil level with pruning shears. Stalk height was determined from the bottom of the stalk to the first visible dewlap leaf from the top (= F1 leaf) with a measuring tape, and the number of internodes was counted. F1-F4 (= fourth visible dewlap leaf from the top) leaves and F1 leaf of the tiller were sampled and immediately used for detection of SCYLV by TBIA. Remaining leaf tissue was stored at -20°C until detection of the virus by DAS-ELISA and RT-PCR.

Determination of percent surface of SCYLV-infected phloem cells by tissue blot immunoassay (TBIA)

TBIA with freshly cut surface of leaves and stalks was performed as described by Schenck *et al.* (1997), except that Fast Blue BB salt (Sigma®) was used. Membranes were analyzed with a stereomicroscope (x 100) to identify SCYLV-infected vascular bundles and to determine severity of infection of phloem cells. Each infected vascular bundle was divided in 10 sectors, and the number of blue coloured sectors was used to calculate the percent surface of phloem cells infected by SCYLV: number of blue sectors/10 x 100. All vascular bundles were observed in each leaf or stalk imprint. TBIA was repeated once with each sample with an other freshly cut surface, 1-2 mm below the first section. The average percent surface of phloem cells infected by SCYLV in each leaf or stalk imprint was used for statistical analysis

of data.

Virus titre in the top visible dewlap leaf of sugarcane plants

Virus titre in leaf F1 was determined with minus 20°C stored leaf samples by the double antibody sandwich-Elisa (DAS-ELISA) method as described by Scagliusi & Lockhart (2000) with a few modifications. Microtiter plates (Nunc/MaxiSorp or Corning/Costar) were coated with 0.3 µg SCYLV IgG in 150 µL sodium carbonate coating buffer (0.05 M, pH 9.6), and incubated for 2 h at 37°C. Plates were then rinsed three times with phosphate buffered saline plus tween (PBST) (20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, 0.05% Tween-20, pH 7.4). One gram of leaf tissue (lamina and midrib) was ground in 10 ml Sorensen extraction buffer [100 mM sodium phosphate pH 6.4, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 0.5% mercaptoethanol, and 0.05% tween-20] in a plastic bag on ice with a ball homogenizer. Homogenized leaf material was deposited in microtitre wells (150 µL/well) and the plates were placed at 4°C overnight. After rinsing three times with PBST buffer, 150 µL of SCYLV IgG alkaline phosphate conjugate solution [diluted 1:1,000 with tris buffered saline plus tween (TBST) (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05%-tween 20) plus 0.2% bovine serum albumine (BSA), 2% PVP-40, and 5% non fat dry milk (NDM)] was added and the plates were incubated for 3 h at 37°C. Plates were rinsed three times with TBST and 150 µL p-nitrophenyl-phosphate substrate (pNPP Sigma FAST, prepared immediately before use) was added. Plates were incubated at room temperature for 1-2 h until a yellow colour developed. Optical density was measured at 405 nm with microplate reader MRX (Dynatech Laboratories).

Detection of sugarcane yellows phytoplasma (SCYP) by nested-PCR

Total DNA from the top visible dewlap leaf (F1) was extracted and purified from sugarcane leaves (500 mg of lamina and midrib) with the DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total DNA was eluted in a final volume of 100 µl of diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water and stored at -20 °C. Detection of SCYLP was performed by nested-PCR with three plants from each sugarcane cultivar x geographical origin combination. Universal phytoplasma primer pair fP1/rP7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) was used in the first-round PCR to amplify parts of the ribosomal operon comprising the 16S rRNA gene of phytoplasmas, followed by the primer pair fU5/m23sr (Lorenz *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995). Nested-PCR was performed using the Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences). In the first-round PCR, 22 µl of DEPC

water, 1 µl of each primer fP1 and rP7 (10 µM) and 1 µl of eluted DNA were added to each reaction tube. The PCR programme was 95°C for 3 min, 20 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 1 min and 72°C for 1.5 min, and 15 cycles of 95°C for 30 sec, 50°C for 1 min and 72°C for 1.5 min, and a final 72°C extension step for 10 min. In the second-round PCR, 22 µl of DEPC water, 1 µl of each primer fU5 and m23sr (10 µM) and 1 µl of first-round PCR product were added to each new reaction tube. The PCR programme was identical to the first-round PCR programme described above. Leaf samples infected by the sugarcane white leaf phytoplasma (Chen & Kusalwong, 2000) were used as positive control, and the amplified fragment had an expected size of 1650 bp.

Detection of other sugarcane viruses by RT-PCR

Total RNA extracted from leaves for detection of SCYLV (see above) was used for detection of *Potyviridae* viruses including *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV) and *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). RT-PCR was performed with primer pair Oligo1n and Oligo2n for SCMV and SrMV, and primer pair ST2-ST5 for SCSMV as described by Chatenet *et al.* (2005). Symptomatic leaf samples infected by these viruses were used as positive control (Chatenet *et al.*, 2005). The amplified fragment had an expected size of approximately 330 bp for SCMV and SrMV, and 400 bp for SCSMV.

Statistical analyses of data

Computer programmes of SAS release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, USA) were used for data analyses. Variance analysis was performed with grouped data of the two identical trials set up every year and for three years. A statistical treatment was the combination of a sugarcane cultivar and a virus isolate (= geographical origin of the sugarcane cultivar). Data for each parameter were analysed using the value of each plant measured in each of the 20 blocks (10 blocks par trial). The treatment x trial interaction was systematically tested but it was found negligible most of the time, thus validating grouping of data.

Results

Identity and infection status of sugarcane plants

SCYLV-infected and virus-free cuttings of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 were imported to Montpellier from six and five different geographical locations, respectively.

Plants of cultivar R570 issued from these cuttings from five geographical locations carried the same 18 alleles as shown by DNA fingerprinting with three SSR markers. Similarly, plants of cultivar SP71-6163 from four geographical locations carried the same 14 alleles. Among the 22 alleles detected with the three SSR markers, eight were unique of cultivar R570, four were unique of cultivar SP71-6163, and 10 were common to both cultivars. For each cultivar, plants from one geographical location showed a different and unknown DNA pattern, and these plants belonging to unidentified cultivars were discarded from the experiment. Plants from all geographical locations were tested for SCYLV, *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV), and sugarcane yellows phytoplasma (SCYP). SCYLV was the only pathogen detected in these plants.

Plants of cultivar R570 from Florida were infected by SCYLV genotype BRA-PER, and plants of this cultivar from Guadeloupe and Réunion Island were infected by genotype REU. Plants of cultivar R570 from Brazil and Mauritius were infected by both genotypes (Table 1). RT-PCR bands obtained with plants from Brazil were stronger with genotype BRA-PER primers than with genotype REU primers, suggesting that genotype BRA-PER was the main genotype in these plants. In contrast, RT-PCR bands obtained with plants from Mauritius were stronger with genotype REU primers than with genotype BRA-PER primers, suggesting that genotype REU was the main genotype in these plants. The SCYLV genotype identified for each geographical origin of cultivar R570 was identical in all sampled plants, and whatever the experimental year. Plants of cultivar SP71-6163 from Brazil and Colombia were infected by SCYLV genotype BRA-PER, and plants of this cultivar from Guadeloupe were simultaneously infected by genotypes BRA-PER and REU. RT-PCR bands obtained with plants from Guadeloupe were stronger with genotype REU primers than with genotype BRA-PER primers, suggesting that genotype REU was the main genotype in these plants. The genotype identified in plants of cultivar SP71-6163 was identical in all sampled plants from Brazil and Colombia, and whatever the experimental year. The mixed infection of plants from Guadeloupe was identified in the trials performed in 2003 and 2005, but only SCYLV genotype REU was detected in the two trials established in 2004.

Severity of disease symptoms

No symptoms of yellow leaf were observed during the first three months of sugarcane growth in the greenhouse, whatever the cultivar and the origin of plants. AUDPC values and the last recorded disease scores at the end of each trial were low for plants of sugarcane cultivar R570 (Table 2). Additionally, no difference in severity of yellow leaf symptoms was found between

plants of cultivar R570 from Brazil, Florida, Guadeloupe, Mauritius, and Réunion Island, whatever the trial. A few virus-free control plants of cultivar R570 also exhibited leaf yellowing, and severity of this yellowing was not different from severity of symptoms observed in SCYLV-infected plants.

AUDPC values and the last recorded disease scores at the end of each trial varied for infected plants of sugarcane cultivar SP71-6163 between 0.6 and 2.4 (on a scale of 0-5) and between 0.8 and 3.6 (also on a scale of 0-5), respectively. Although a few virus-free control plants exhibited leaf yellowing, disease severity of plants infected by SCYLV was always higher. Differences in severity of yellow leaf symptoms were found between plants from different origins. Disease severity values (AUDPC or last recorded score) of plants from Guadeloupe were always higher than for plants from Brazil, with the exception of the last recorded score in the 2003 trials. With the exception of the 2004 trials and AUDPC values, disease severity of plants from Colombia was not different from disease severity of plants from Guadeloupe.

Growth characteristics of sugarcane plants

Stalk length and number of internodes differed in each trial between plants of cultivar R570 from different geographical origins, and between SCYLV-infected and control plants (Table 3). However, these differences also varied from one trial to another and no clear cut growth pattern could be identified. Stalk length and number of internodes did not vary between plants of cultivar SP71-6163 from Brazil, Colombia and Guadeloupe in the 2003 and 2004 trials. However, these two growth characteristics varied between plants in the 2005 trials, and differences in stalk length were also found between control plants from Guadeloupe and South Africa.

Severity of infection of phloem vessels in the main stalk and a tiller

SCYLV was detected in all main stalks and tillers issued from virus-infected cuttings, with the exception of two plants of sugarcane cultivar SP71-6163 from Guadeloupe (one plant in 2004 and one in 2005). Percent surface of stalk or tiller phloem vessels infected by SCYLV varied in sugarcane cultivar R570 between 17% (upper stalk part of plants from Brazil in 2005) to 66% (lower stalk part of plants from Guadeloupe in 2006), and it differed in each trial between plants of cultivar R570 from different geographical origins (Table 4). However, these differences sometimes also varied according to stalk location (upper, medium or lower part of the stalk) and from one trial to another, and no clear cut pattern could be identified.

Percent surface of stalk or tiller phloem vessels infected by SCYLV did not vary between plants of cultivar SP71-6163 from Brazil, Colombia and Guadeloupe in the 2003 and 2004 trials, with the exception of the upper stalk in the 2004 trials. The same result was observed in the 2005 trials but in these latter trials, phloem vessels in the lower part of stalks of plants from Colombia were less infected by SCYLV than phloem vessels in the lower part of stalks from Brazil and Guadeloupe.

Severity of infection of phloem vessels in leaves of the main stalk and of a tiller

SCYLV was detected in all leaves and tillers of plants issued from virus-infected cuttings, with the exception of two plants of sugarcane cultivar SP71-6163 from Guadeloupe (one plant in 2004 and one in 2005). Percent surface of leaf phloem vessels infected by SCYLV varied in sugarcane cultivar R570 between 13% (F4 leaf of plants from Florida in 2004) to 63% (F1 leaf of plants from Réunion Island in 2003) (Table 5). F1-F4 leaves of the main stalk of plants of cultivar R570 from Florida were less infected by SCYLV than those from Guadeloupe and Réunion Island in 2003 and 2004, with the exception of the F1 leaf of plants from Guadeloupe in 2004. Percent surface of leaf phloem vessels of plants of cultivar R570 from Réunion Island were similar or higher than the one of plants of this cultivar from Brazil, Florida and Mauritius. Percent surface of leaf phloem vessels infected by SCYLV varied in sugarcane cultivar SP71-6163 between 13% (F4 leaf of plants from Colombia in 2003) to 51% (F1 leaf of plants from Guadeloupe in 2003) (Table 5). No differences were observed between plants from Brazil, Colombia and Guadeloupe with the exception of the F4 leaf in 2003, the tiller leaf in 2004 and the F2-F3 leaves in 2005. These few differences were, however, not associated with a reproducible pattern: percent virus-infected surface of phloem vessels was highest in F4 and the tiller leaves of plants from Brazil in 2003 and 2004, respectively, but it was the lowest in the F2 leaf in 2005.

Virus titre in the top visible dewlap leaf

In the 2003 trials, the virus titre in the top visible dewlap leaf was lower in plants of cultivar R570 from Florida than in plants of this cultivar from Guadeloupe and Réunion Island (Table 6). This difference was also found between plants from Florida and plants from Réunion Island in the 2004 trials, but in these latter trials the virus titre of plants from Florida and Guadeloupe was identical. Leaves of cultivar R570 from Brazil had the highest virus titre in the 2004 trials. In the 2003 and 2004 trials, the virus titre in the top visible dewlap leaf was higher in plants of cultivar SP71-6163 from Brazil and Colombia than in plants from

Guadeloupe. No data were available for the 2005 trials because of accidental loss of leaf samples.

Discussion

Because sugarcane is propagated by vegetative means (stalk cuttings), planting material of a cultivar imported from different locations should be identical except for infections by plant pathogens. Besides SCYLV, no other pathogen was found in sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 imported from Brazil, Colombia, Florida, Guadeloupe, Mauritius, Réunion Island or South Africa. Additionally, sugarcane plants used herein did not exhibit any disease symptom other than leaf yellowing symptoms. Genetic identity of plants from each geographical location was verified in order to avoid the use of mislabelled cultivars that could result in biased experimental data. Differences observed in Montpellier between plants of sugarcane cultivar R570 or between plants of cultivar SP71-6163 from different geographical locations are therefore attributable to differences in SCYLV populations.

Although plants of sugarcane cultivar R570 from various locations were infected by different genotypes of SCYLV, severity of yellow leaf symptoms was weak for all plants of this cultivar and in all trials. In addition, the few symptoms observed in cultivar R570 may not have been caused by SCYLV because similar symptoms were observed in virus-free control plants. Symptoms induced by the *Luteoviridae*, including SCYLV, are often difficult to distinguish from symptoms caused by other pathogens, nutritional deficiencies, or cold weather (D'Arcy, 1995; Lockhart & Cronjé, 2000). Because no other pathogen was detected in control plants, and because these plants did not suffer any apparent nutritional deficiency or cold weather, the origin of symptoms in control plants of cultivar R570 remains unknown. A few yellowing symptoms were also observed for control plants of cultivar SP71-6163 from Guadeloupe and South Africa, but disease severity of plants infected by SCYLV were significantly more severe and were therefore attributed to this pathogen.

Disease severity of cultivar SP71-6163 from Guadeloupe (infected by SCYLV genotypes BRA-PER and REU) was higher than disease severity of cultivar SP71-6163 from Brazil (infected by SCYLV genotype BRA-PER) in most trials, suggesting that a combination of SCYLV genotypes BRA-PER and REU is more virulent than SCYLV genotype BRA-PER alone. Similar results were obtained with different serotypes of *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) for which mixed infections of BYDV-PAV and BYDV-RPV caused more severe

symptoms, including more stunting and higher virus titre, than infections with each virus alone (Baltenberger *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1997; Miller & Rasochová, 1997). However, disease severity of cultivar SP71-6163 from Colombia (infected by SCYLV genotype BRA-PER) was also higher than disease severity of cultivar SP71-6163 from Brazil, suggesting that variation of virulence also occurs within genotype BRA-PER. Similar variation in disease severity between virus genotypes or isolates was reported for other viruses of the *Luteoviridae* family such as BYDV (Chaloub *et al.*, 1994; Chay *et al.*, 1996; Beckett *et al.*, 1996) and *Potato leafroll virus* (PLRV). Strain PLRV-TYT causes tomato yellow top disease, whereas tomato plants infected by typical potato strains of PLRV are almost symptomless (Thomas, 1984).

Although stalk length and number of internodes differed between plants of sugarcane cultivar R570 and between plants of cultivar SP71-6163 from different locations, differences varied and were even sometimes contradictory from one trial to another. These data could therefore not be used for differentiation of SCYLV genotypes in our experimental conditions.

With the exception of two plants out of 180 plants of cultivar SP71-6163 (three origins and three years of experimentation, see table 4), plants issued from SCYLV-infected cuttings were always colonized by the pathogen, whatever the SCYLV genotype and the origin of sugarcane cuttings. These data confirmed previous observations made with different sugarcane cultivars grown in Réunion Island (Rassaby *et al.*, 2004). However, the absence of detection of SCYLV in leaves and stalks of two plants showed that, even at low level, some plants can recover from the virus, as it has been observed for other viral sugarcane diseases (Walker, 1997) or that SCYLV populations were below detectable levels. SCYLV was not detected in these plants by TBIA, but neither by RT-PCR (Abu Ahmad, results not shown). However, it cannot be excluded that the pathogen could have been detected by more sensitive methods such as real-time RT-PCR assays (Gonçalves *et al.*, 2002; Korimbocus *et al.*, 2002a).

Severity of infection of phloem vessels in the main stalk, in a tiller and in leaves differed between plants of sugarcane cultivar R570, and between plants of cultivar SP71-6163 from different locations. However, data were too variable from one year to another to identify reproducible infection patterns for the different plants. Among the different parameters used to measure populations of SCYLV *in planta*, virus titre in the top visible dewlap leaf appeared to be the most reproducible from one year trial to another, but missing data of the 2005 trials may weaken this conclusion. However, variation of SCYLV concentrations in plants of cultivar R570 from different geographical origins, and exhibiting no disease symptoms, clearly showed that virus concentrations were not correlated with disease symptoms. Data

obtained with sugarcane cultivar SP71-6163 confirmed this conclusion because the most diseased plants of this cultivar (plants from Guadeloupe infected by SCYLV genotypes BRA-PER) had a lower virus titre than plants with low disease severity (plants from Brazil infected by SCYLV genotype BRA-PER).

Most disease characteristics measured herein were not reproducible from one year trial to another, suggesting a strong effect of environmental conditions on disease progress or evolution of SCYLV populations in sugarcane, as it was already observed for other *Luteoviridae* such as BYDV (Harrington, 2002). Although the trials were performed each year in Montpellier during the same season (May-October), climatic conditions were not identical every year. Changes in climatic conditions may have triggered modifications in the virus populations *in planta* or in the ability of the plant to react against the pathogen. Variation of SCYLV genotypes in sugarcane cultivar SP71-6163 from Guadeloupe supports this hypothesis: genotype BRA-PER was detected in all tested plants in the 2003 and 2005 trials, but not in the trials established in 2004.

Results reported herein are evidence that variants in pathogenicity exist within SCYLV, and symptoms and virus titre in leaves appear to be the best indicators to monitor these variants. Additional studies will include inoculation of healthy sugarcane plants of sugarcane cultivars differing in resistance to yellow leaf with several genotypes of SCYLV. Preliminary results suggest the existence of different strains of SCYLV in Guadeloupe and Réunion Island (Abu Ahmad *et al.*, unpublished).

Acknowledgments

We thank Marie-Josée Darroussat, Jean-François Bousquet, Rémy Habas and Marc Muller for technical assistance, and Tania Van Antwerpen (Sasri, South Africa), William Burnquist (Copersucar, Brazil), Jack Comstock (USDA-ARS, Florida), Laurent Costet (Cirad, Réunion Island), Jean-Heinrich Daugrois (Cirad, Guadeloupe), Salem Saumtally (MSIRI, Mauritius) and Jorge Victoria (Cenicaña, Colombia) for supplying sugarcane cuttings of cultivars R570 and SP71-6163. We also thank Erik Mirkov and Jorge I. Victoria for fruitful discussions. This research was conducted during the thesis scholarship programme of Youssef Abu Ahmad, supported by the Government of Syrian Arabic Republic and Cenicaña in Colombia.

References

Abu Ahmad Y, Rassaby L, Royer M, Borg Z, Braithwaite KS, Mirkov TE, Ireys MS, Perrier

- 460 X, Smith GR, Rott P, 2006a. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different
461 genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of
462 Réunion. *Archive of Virology* **151**, 1355-71.
- 463 Abu Ahmad Y, Royer M, Daugrois JH, Costet L, Lett JM, Victoria JI, Girard JC, Rott P,
464 2006b. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant*
465 *Disease* (in press).
- 466 Aljanabi SM, Parmessur Y, Moutia Y, Saumtally S, Dookun A, 2001. Further evidence of the
467 association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. *Plant*
468 *Pathology* **50**, 628-36.
- 469 Arocha Y, López M, Fernández M, Piñol B, Horta D, Peralta EL, Almeida R, Carvajal O,
470 Picornell S, Wilson MR, Jones P, 2005. Transmission of a sugarcane yellow leaf
471 phytoplasma by the delphacid planthopper *Saccharosydne saccharivora*, a new vector of
472 sugarcane yellow leaf syndrome. *Plant Pathology* **54**, 634-42.
- 473 Baltenberger DE, Ohm HW, Foster JE, 1987. Reactions of oat, barley, and wheat to infection
474 with barley yellow dwarf isolates. *Crop Science* **27**, 195-8.
- 475 Beckett R, Testroet A, Chay C, Gray SM, Miller WA, 1996. Sequence analysis of two severe
476 isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* **86**, S75 (Abstract).
- 477 Borg Z, Moonan F, Braithwaite K, Mirkov TE, Smith G, 2001. Characterising the genetic
478 diversity of Sugarcane yellow leaf virus. *Proceedings of the International Society of Sugar*
479 *Cane Technologists Congress* **24**, 654-6.
- 480 Borth W, Hu JS, Schenck S, 1994. Double-stranded RNA associated with sugarcane
481 yellowleaf syndrome. *Sugar Cane* **3**, 5-8.
- 482 Campbell CL, Madden LV, 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York,
483 USA: Wiley-Interscience.
- 484 Chaloub BA, Kelly L, Robaglia C, Lapierre HD. 1994. Sequence variability in the genome-3'-
485 terminal region for 10 geographically distinct PAV-like isolates of barley yellow dwarf
486 virus: analysis of the ORF6 variation. *Archives of Virology* **139**, 403-16.
- 487 Chatenet M, Delage C, Ripolles M, Irely M, Lockhart BEL, Rott P, 2001. Detection of
488 *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical
489 meristem culture. *Plant Disease* **85**, 1177-80.
- 490 Chatenet M, Mazarin C, Girard J-C, Fernandez E, Gargani D, Rao GP, Royer M, Lockhart B,
491 Rott P, 2005. Detection of *Sugarcane streak mosaic virus* in sugarcane from several Asian
492 countries. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists Congress*
493 **25**, 656-63.

- 494 Chay CA, Smith DM, Vaughan R, Gray SM, 1996. Diversity among isolates within the PAV
495 serotype of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* **86**, 370-7.
- 496 Chen CT, Kusalwong A, 2000. White leaf. In: Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ,
497 Saumtally AS, eds. A guide to sugarcane diseases. Montpellier, France: La Librairie du
498 Cirad, 231-6.
- 499 Comstock JC, Miller JD, 2004. Yield comparisons: Disease-free tissue-culture versus bud-
500 propagated sugarcane plants and healthy versus yellow leaf infected plants. *Journal of the*
501 *American Society of Sugar Cane Technologists* **24**, 31-40.
- 502 Comstock JC, Irvine JE, Miller JD, 1994. Yellow leaf syndrome appears on the United States
503 mainland. *Sugar Journal* **56**, 33-5.
- 504 Comstock JC, Irely MS, Lockhart BEL, Wang ZK, 1998. Incidence of yellow leaf syndrome
505 in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane*
506 **4**, 21-4.
- 507 Cronjé CPR, Tymon AM, Jones P, Bailey RA, 1998. Association of a phytoplasma with a
508 yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. *Annals of Applied Biology* **133**, 177-86.
- 509 D'Arcy CJ, 1995. Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ &
510 Burnett PA, eds. *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*. St. Paul, MN, USA: American
511 Phytopathological Society Press, 9-28.
- 512 D'Arcy CJ, Domier LL, 2005. Luteoviridae In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J,
513 Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International*
514 *Committee on Taxonomy of Viruses*. New York, USA: Elsevier Academic Press, 891-900.
- 515 Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable
516 Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* **14**, 53-61.
- 517 Flynn J, Powell G, Perdomo R, Montes G, Quebedeaux K, Comstock J, 2005. Comparison of
518 sugarcane disease incidence and yield of field-run, heat-treated, and tissue-cultured based
519 seedcane. *Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists* **25**, 88-100.
- 520 Fontaniella B, Vicente C, Legaz EM, de Armas R, Rodriguez CW, Martínez M, Piñón D,
521 Acevedo R, Solas MT, 2003. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane
522 juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**,
523 1027-36.
- 524 Gonçalves MC, Klerks MM, Verbeek M, Vega J, van den Heuvel JFJM, 2002. The use of
525 molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane yellow*
526 *leaf virus*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 401-7.
- 527 Gonçalves CM, Vega J, Oliveira GJ, Gomes MAM, 2005. Sugarcane yellow leaf virus

- 528 infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in
- 529 sugarcane leaves. *Fitopatologia Brasileira* **30**, 10-6.
- 530 Grisham MP, Pan YB, White WH, Godshall MA, Legendre BL, Comstock JC, 2002.
- 531 Potential effect of yellow leaf syndrome on the Louisiana sugarcane industry. *Journal of*
- 532 *the American Society of Sugar Cane Technologist* **22**, 125-6.
- 533 Harrington R, 2002. BYDV: The heat is on. In: Henry M & McNab A, eds. *Barley yellow*
- 534 *dwarf disease: Recent advances and future strategies*. Mexico, DF: CIMMYT, 34-9.
- 535 Izaguirre-Mayoral ML, Carballo O, Alceste C, Romano M, Nass HA, 2002. Physiological
- 536 performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcane in Venezuela.
- 537 *Journal of Phytopathology* **150**, 13-9.
- 538 Korimbocus J, Coates D, Barker I, Boonham N, 2002a. Improved detection of Sugarcane
- 539 yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *Journal of*
- 540 *Virological Methods* **103**, 109-20.
- 541 Korimbocus J, Preston S, Danks C, Barker I, Coates D, Boonham N, 2002b. Production of
- 542 monoclonal antibodies to Sugarcane yellow leaf virus using recombinant readthrough
- 543 protein. *Journal of Phytopathology* **150**, 488-94.
- 544 Lehrer AT, Schenck S, Fitch MMM, Moore PH, Komor E, 2001. Distribution and
- 545 transmission of sugarcane yellow leaf virus (SCYLTV) in Hawaii and its elimination from
- 546 seedcane. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists Congress*
- 547 **24**, 439-443.
- 548 Lockhart BEL, Cronjé CPR, 2000. Yellow leaf syndrome. In: Rott P, Bailey RA, Comstock
- 549 JC, Croft BJ, Saumtally AS, eds. *A guide to sugarcane diseases*. Montpellier, France: La
- 550 Librairie du Cirad, 291-5.
- 551 Lockhart BEL, Irey MS, Comstock JC, 1996. Sugarcane bacilliform virus, sugarcane mild
- 552 mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. In: Croft BJ, Piggin CM, Wallis ES,
- 553 Hogarth DM, eds. *Sugarcane germplasm conservation and exchange*. Canberra, Australia:
- 554 *Australian Centre for International Agricultural Research*, 108-12.
- 555 Lorenz K-H, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E, 1995. Detection of the apple proliferation
- 556 and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal
- 557 DNA. *Phytopathology* **85**, 771-6.
- 558 Matsuoka S, Meneghin SP, 1999. Yellow leaf syndrome and alleged pathogens: a casual but
- 559 not a causal relationship. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane*
- 560 *Technologists Congress* **23**, 382-9.
- 561 Miller WA, Koev G, Mohan BR, 1997. Are there risks associated with transgenic resistance

- 562 to luteoviruses? *Plant Disease* **81**, 700-710.
- 563 Miller WA, Rasochová L, 1997. Barley yellow dwarf viruses. *Annual Review of*
564 *Phytopathology* **35**, 167-90.
- 565 Moonan F, Mirkov TE, 2002. Analyses of the genotypic diversity among North, South, and
566 Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*. Evidence for Colombian origins
567 and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *Journal of Virology* **76**, 1339-48.
- 568 Moonan, F, Molina J, Mirkov TE, 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that
569 has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* **269**,
570 156-71.
- 571 Moutia J-FY, Saumtally S, 2001. Diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in cane juice and
572 the effect of hot water treatment on its control. *Proceedings of the International Society of*
573 *Sugar Cane Technologists Congress* **24**, 444-50.
- 574 Padovan AC, Gibb KS, Bertaccini A, Vibio M, Bonfiglioli RE, Magarey PA, Sears BB, 1995.
575 Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with
576 grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine*
577 *Research* **1**, 25 31.
- 578 Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irely MS, Lockhart BEL, Kodja H, Rott P,
579 2003. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in
580 Réunion Island. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 459-66.
- 581 Rassaby L, Girard JC, Lemaire O, Costet L, Irely MS, Kodja H, Lockhart BEL, Rott P, 2004.
582 Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the Island of
583 Réunion. *Plant Pathology* **53**, 117-25.
- 584 Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C, 2000. A high
585 density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theoretical and Applied Genetics, **101**: 948-
586 55.
- 587 Rossi M, Araujo PG, Paulet F, Garsmeur O, Dias VM, Chen H, Van Sluys MA, D'Hont A,
588 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs
589 (RGAs) in sugarcane. *Molecular Genetics and Genomics*, **269**: 406-19.
- 590 Rott P, Comstock JC, Croft BJ, Kusalwong A, Saumtally SA, 2005. Advances and challenges
591 in sugarcane pathology. *Proceedings of the International Society of Sugarcane*
592 *Technologists Congress* **25**, 607-14.
- 593 Scagliusi SM, Lockhart BEL, 2000. Transmission, characterization, and serology of a
594 luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathology* **90**, 120-24.
- 595 Schenck S, 2001. Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts. In: Rao GP,

- 596 Ford RE, Tosic M, Teakle DS, eds. *Sugarcane pathology, Vol. II: Virus and Phytoplasma*
597 *Diseases*. Enfield, USA: Science Publishers Inc, 25-35.
- 598 Schenck, S, Lehrer AT, 2000. Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane*
599 *yellow leaf virus*. *Plant Disease* **84**, 1085–88.
- 600 Schenck S, Hu JS, Lockhart BEL, 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the
601 distribution of *Sugarcane yellow leaf virus* in Hawaii. *Sugar Cane* **4**, 5-8.
- 602 Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC, 1995. Phylogenetic classification of
603 plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG, eds.
604 *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. San Diego, USA: Academic
605 Press, 369-80.
- 606 Smith GR, Borg Z, Lockhart BEL, Braithwaite KS, Gibbs MJ, 2000. Sugarcane yellow leaf
607 virus: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species
608 recombination. *Journal of General Virology* **81**, 1865-9.
- 609 Thomas JE, 1984. Characterisation of an Australian isolate of tomato yellow top virus. *Annals*
610 *of Applied Biology* **104**, 79-86.
- 611 Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC, 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of
612 association with a luteovirus. *Plant Disease* **81**, 21–6.
- 613 Viswanathan R, 2002. Sugarcane yellow leaf syndrome in India: Incidence and effect on yield
614 parameters. *Sugar Cane International*, Sep-Oct: 17-23.
- 615 Walker DIT, 1987. Breeding for disease resistance. In: Heinz DJ, ed. *Sugarcane Improvement*
616 *Through Breeding*. Amsterdam, The Netherlands: Science Publishers, 455-502.
- 617

Table 1 Origin and infection status of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 grown for three years in a greenhouse in Montpellier/France^a

Sugarcane cultivar	Imported from	Genotype of SCYLV identified in ^b		
		2003	2004	2005
R570 infected by SCYLV	Brazil	- ^c	BRA-PER and REU	BRA-PER and REU
	Florida/USA	BRA-PER	BRA-PER	-
	Guadeloupe	REU	REU	REU
	Mauritius	-	-	BRA-PER and REU
	Reunion Island	REU	REU	REU
R570 virus-free (control)	Reunion Island	-	ND ^d	ND
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	BRA-PER	BRA-PER
	Colombia	BRA-PER	BRA-PER	BRA-PER
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	REU	BRA-PER and REU
SP71-6163 virus-free (control)	Guadeloupe	-	ND	ND
	South Africa	-	ND	ND

^aAfter import of cuttings into Montpellier, sugarcane plants were re-grown every year from cuttings sampled from infected or control stalks cultivated the previous year (plants were maintained in a glasshouse between two consecutive trials).

^bGenotype identification was performed by RT-PCR with specific primers as described by Abu Ahmad *et al.* (2006b); six leaf samples (three from each trial) were used each year for each cultivar x origin combination; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

^cPlants not included in this experiment.

^dNot determined.

Table 2 Severity of yellow leaf symptoms in sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV and originating from different geographic locations

			Severity of symptoms in greenhouse trial ^a					
			2003		2004		2005	
			AUDPC	Last score	AUDPC	Last score	AUDPC	Last score
Sugarcane cultivar	Imported from	SCYLV genotype ^b						
R570 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER and REU	- ^c	-	0.1 a	0.3 a	0.1 a	0.3 a
	Florida/USA	BRA-PER	0.7 a	0.8 a	0.2 a	0.8 a	-	-
	Guadeloupe	REU	0.6 a	0.7 a	0.1 a	0.3 a	0.3 a	0.3 a
	Mauritius	BRA-PER and REU	-	-	-	-	0.3 a	0.4 a
	Reunion Island	REU	0.8 a	1.0 a	0.1 a	0.4 a	0.1 a	0.2 a
R570 virus-free (control)	Reunion Island	ND ^d	-	-	0.1 a	0.3 a	0.1 a	0.3 a
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	0.6 a	1.5 a	0.6 b	1.6 c	0.6 b	0.8 b
	Colombia	BRA-PER	1.1 b	1.5 a	0.9 b	2.6 d	2.2 c	3.1 c
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	1.2 b	1.8 a	1.4 c	2.9 d	2.4 c	3.6 c
SP71-6163 virus-free (control)	Guadeloupe	ND	-	-	0.2 a	0.4 a	0 a	0.1 a
	South Africa	ND	-	-	0.2 a	0.7 b	0.1 a	0.3 ab

634 ^aGroup of two randomized block designs with 10 replications of one plant per plot each. AUDPC (area under disease progress curve) was
 635 calculated with the data from ten observation times after planting of sugarcane cuttings; last disease score was determined at the end of the
 636 experiment, 5-6 months after planting of cuttings. In each column and for each cultivar, mean values followed by the same letter are not
 637 significantly different at $P = 0.05$ according to variance analysis and lsd (least significant difference) grouping.

638 ^bSee table 1; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

639 ^cPlants not included in this experiment.

640 ^dNot determined.

641 **Table 3** Growth characteristics of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV and originating from different geographic
 642 locations

Sugarcane cultivar	Imported from	SCYLV genotype ^b	Length and number of internodes of the main stalk in greenhouse trial ^a					
			2003		2004		2005	
			Length (cm)	Number of internodes	Length (cm)	Number of internodes	Length (cm)	Number of internodes
R570 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER and REU	- ^c	-	125.2 a	11 a	86.4 a	9 ab
	Florida/USA	BRA-PER	148.4 a	10 ab	120.9 a	11 a	-	-
	Guadeloupe	REU	162.3 b	10 a	142.1 b	12 b	81.0 a	9 ab
	Mauritius	BRA-PER and REU	-	-	-	-	84.9 a	9 a
	Reunion Island	REU	158.7 b	11 b	124.8 a	11 a	84.0 a	9 ab
R570 virus-free (control)	Reunion Island	ND ^d	-	-	128.3 a	12 b	95.9 b	10 b
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	133.3 a	7 a	125.9 a	11 a	80.0 a	8 a
	Colombia	BRA-PER	145.8 a	9 b	125.6 a	11 a	104.3 c	10 b
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	142.7 a	9 b	125.7 a	11 a	92.0 b	9 ab
SP71-6163 virus- free (control)	Guadeloupe	ND	-	-	152.5 b	12 b	107.7 c	9 b
	South Africa	ND	-	-	155.9 b	12 b	118.1 d	10 b

644 ^aGroup of two randomized block designs with 10 replications of one plant per plot each; length and number of internodes of the main stalk were
645 determined at the end of the experiment, 5-6 months after planting of cuttings. In each column and for each cultivar, mean values followed by the
646 same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to variance analysis and lsd (least significant difference) grouping.

647 ^bSee table 1; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

648 ^cPlants not included in this experiment.

649 ^dNot determined.

650

651 **Table 4** Severity of infection of phloem vessels in stalks and tillers of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV and
 652 originating from different geographic locations

			Percent surface of phloem vessels infected by SCYLV in the main stalk and a tiller in greenhouse trial ^a											
			2003				2004				2005			
Sugarcane cultivar	Imported from	SCYLV genotype ^b	Stalk low	Stalk med	Stalk up	Tiller	Stalk low	Stalk med	Stalk up	Tiller	Stalk low	Stalk med	Stalk up	Tiller
R570 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER and REU	- ^c	-	-	-	47 b	38 a	22 a	41 a	49 a	47 a	17 a	42 a
	Florida/USA	BRA-PER	50 a	46 a	41 a	51 b	40 ab	42 a	20 a	39 a	-	-	-	-
	Guadeloupe	REU	59 b	50 a	39 a	51 b	57 c	52 b	21 a	45 a	66 b	53 ab	17 a	53 b
	Mauritius	BRA-PER and REU	-	-	-	-	-	-	-	-	52 a	55 b	20 a	42 a
	Reunion Island	REU	47 a	49 a	40 a	43 a	54 c	48 b	28 b	43 a	45 a	44 a	21 a	38 a
R570 virus-free (control)	Reunion Island	ND ^d	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	49 a	55 a	43 a	51 a	32 a	48 a	29 b	53 a	50 b	57 a	26 b	54 a
	Colombia	BRA-PER	43 a	52 a	48 a	46 a	27 a	42 a	24 ab	51 a	41 a	56 a	23 b	57 a
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	40 a	48 a	42 a	52 a	29 a	44 a	22 a	52 a	49 b	53 a	18 a	52 a
SP71-6163 virus- free (control)	Guadeloupe	ND	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0

South Africa	ND	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
--------------	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

653

654 ^aGroup of two randomized block designs with 10 replications of one plant per plot each; percentage of surface of phloem vessels infected by
 655 SCYLV was determined by TBIA at the end of the experiment, 5-6 months after planting of cuttings; stalk low, stalk med and stalk up = lower,
 656 medium and upper part of the main stalk, respectively. In each column and for each cultivar, mean values followed by the same letter are not
 657 significantly different at $P = 0.05$ according to variance analysis and lsd (least significant difference) grouping. Because data of control plants
 658 were nil, they were not included in the statistical analyses.

659 ^bSee table 1; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

660 ^cPlants not included in this experiment.

661 ^dNot determined.

662

663 **Table 5** Severity of infection of phloem vessels in leaves of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV and originating from
 664 different geographic locations

			Percent surface of phloem vessels infected by SCYLV in leaves of the main stalk and a tiller in greenhouse trial ^a														
Sugarcane cultivar	Imported from	SCYLV genotype ^b	2003					2004					2005				
			F1	F2	F3	F4	Ti	F1	F2	F3	F4	Ti	F1	F2	F3	F4	Ti
R570 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER and REU	- ^c	-	-	-	-	30 a	32 b	28 b	26 b	22 a	36 a	43 a	48 a	45 a	37 ab
	Florida/USA	BRA-PER	41 a	43 a	33 a	30 a	38 a	25 a	19 a	14 a	13 a	21 a	-	-	-	-	-
	Guadeloupe	REU	59 b	63 b	59 b	46 b	46 ab	30 a	29 b	30 b	28 b	26 a	38 ab	41 a	45 a	42 a	32 a
	Mauritius	BRA-PER and REU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40 ab	46 a	48 a	44 a	37 ab
	Reunion Island	REU	63 b	62 b	56 b	44 b	53 b	38 b	33 b	32 b	27 b	25 a	42 b	45 a	52 a	43 a	39 b
R570 virus-free (control)	Reunion Island	ND ^d	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	50 a	33 a	26 a	21 b	28 a	30 a	25 a	20 a	17 a	35 b	38 a	38 a	34 a	28 a	37 a
	Colombia	BRA-PER	45 a	37 a	23 a	13 a	30 a	31 a	27 a	22 a	20 a	29 a	43 a	45 b	42 b	33 a	37 a
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	51 a	35 a	29 a	15 ab	30 a	25 a	19 a	18 a	17 a	26 a	43 a	42 b	31 a	29 a	40 a
SP71-6163 virus-free (control)	Guadeloupe	ND	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	South Africa	ND	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

665

666 ^aGroup of two randomized block designs with 10 replications of one plant per plot each; percentage of surface of phloem vessels infected by

667 SCYLV was determined by TBIA at the end of the experiment, 5-6 months after planting of cuttings; F1-F4 = first to fourth visible dewlap leaf
 668 from the top of the main stalk, Ti = first visible dewlap leaf from the top of a tiller. In each column and for each cultivar, mean values followed
 669 by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to variance analysis and lsd (least significant difference) grouping.
 670 Because data of control plants were nil, they were not included in the statistical analyses.

671 ^bSee table 1; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

672 ^cPlants not included in this experiment.

673 ^dNot determined.

674

675

Table 6 Virus titre in the top visible dewlap leaf of sugarcane cultivars R570 and SP71-6163 infected by SCYLV and originating from different geographic locations

Sugarcane cultivar	Imported from	SCYLV genotype ^b	OD at 405 nm of the top visible dewlap leaf in trial ^a	
			2003	2004
R570 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER and REU	-	0.64 c
	Florida/USA	BRA-PER	0.86 a	0.44 a
	Guadeloupe	REU	1.26 b	0.44 a
	Mauritius	BRA-PER and REU	-	-
	Reunion Island	REU	1.20 b	0.54 b
R570 virus-free (control)	Reunion Island	ND ^d	-	0.09
SP71-6163 infected by SCYLV	Brazil	BRA-PER	1.02 b	0.62 b
	Colombia	BRA-PER	1.00 b	0.57 b
	Guadeloupe	BRA-PER and REU	0.81 a	0.38 a
SP71-6163 virus-free (control)	Guadeloupe	ND	-	0.08
	South Africa	ND	-	0.08

^aGroup of two randomized block designs with 10 replications of one plant per plot each; virus titre was determined by ELISA and expressed as optical density (OD) at the end of the experiment, 5-6 months after planting of cuttings. In each column and for each cultivar, mean values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to variance analysis and lsd (least significant difference) grouping. Because data of control plants were very low, they were not included in the statistical analyses.

^bSee table 1; for mixed infections, the putative main genotype is indicated in bold.

^cPlants not included in this experiment.

^dNot determined.

2.3. Variation de la capacité d'infection et de la virulence entre géotypes de *Sugarcane yellow leaf virus*

Article 5

Abu Ahmad, Y., Costet, L., Daugrois, J.-H., Nibouche, S., Letourmy, P., Girard, J.-C., and Rott, P. 2006. Variation in Infection Capacity and in Virulence Exists Between Genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. Plant Disease (Accepté).

Variation in Infection Capacity and in Virulence Exists Between Genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*

Youssef Abu Ahmad, Cirad, UMR Agro.M-Cirad-Inra Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI), Montpellier Cedex 5, F-34398 France; **Laurent Costet**, Cirad, UMR Cirad-Université de La Réunion Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), Saint-Pierre, La Réunion, F-97410 France; **Jean-Henrich Daugrois**, Cirad, UPR Multiplication Végétative, Petit-Bourg, Guadeloupe, F-97170 France; **Samuel Nibouche**, Cirad, UMR Cirad-Université de La Réunion PVBMT, Saint-Pierre, La Réunion, F-97410 France; **Philippe Letourmy**, Cirad, UPR Aide à la Décision et Biostatistique, Montpellier Cedex 5, F-34398, France; **Jean-Claude Girard** and **Philippe Rott**, Cirad, UMR Agro.M-Cirad-Inra BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, Montpellier Cedex 5, F-34398 France.

Corresponding author: Philippe Rott, Cirad, UMR Agro.M-Cirad-Inra BGPI, Campus International de Baillarguet, TA 41/K, 34398 Montpellier Cedex 5, France; E-mail address: philippe.rott@cirad.fr

ABSTRACT

Abu Ahmad, Y., Costet, L., Daugrois, J.-H., Nibouche, S., Letourmy, P., Girard, J.-C., and Rott, P. 2006. Variation in infection capacity and in virulence exists between genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus*. Plant Dis. xx:xxx-xxx.

Two experiments, one in Guadeloupe and one in Réunion Island, were performed to transmit different genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) to eight sugarcane cultivars differing in resistance to infection by the virus and to yellow leaf. Transmission was attempted from SCYLV-infected sugarcane plants or leaves to healthy tissue-cultured plantlets grown in vitro and with the aphid vector *Melanaphis sacchari*. After inoculation and elimination of insects with an insecticide, plantlets were transferred to Montpellier/France and grown in a greenhouse. Plants were tested for presence of SCYLV by TBIA and RT-PCR after 5 to 6 months of growth.

SCYLV genotypes BRA-PER, CUB and REU were detected in 47%, 62% and 39% of plants inoculated with these genotypes in Guadeloupe, respectively. SCYLV genotypes BRA-PER and REU and a mixed infection of genotypes BRA-PER and REU were detected in 56%, 33% and 42% of plants inoculated with these genotypes in Réunion Island, respectively. Genotypes BRA-PER and CUB could be transmitted to all eight sugarcane cultivars, but genotype REU could never be transmitted to resistant sugarcane cultivars H78-4153 and H78-3567. SCYLV genotype REU was transmitted successfully to sugarcane cultivar R570 in Guadeloupe, but not in Réunion Island. Genotypes BRA-PER and CUB induced yellow leaf symptoms in susceptible or highly susceptible sugarcane cultivars whereas genotype REU induced very few symptoms. SCYLV was not found in several symptomatic plants suggesting an association of disease with undetectable populations of the virus or a non-viral cause. This is the first report of variation in infection capacity and in virulence of SCYLV.

Additional keywords: *Luteoviridae*, *Polerovirus*, virus acquisition.

Yellow leaf of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) is caused by *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) and diseased plants may exhibit intense yellowing of the leaf midrib. This discoloration of leaves often occurs while the lamina is still green. Symptoms also include shortening of terminal internodes, yellowing and necrosis of older leaves. However, most of these symptoms may be related to other biotic or abiotic factors (17,19). The disease is also associated with reduction in sucrose content in stalks, accumulation of sucrose in leaf midribs and yield losses (10,11,15,16,27,33). Incidence of SCYLV in commercial fields can reach 100% in susceptible cultivars (7,28,35), and hot water treatment of cuttings is not effective in eliminating the virus from infected material (6,25). Because infected plants are often asymptomatic, SCYLV was spread world wide through infected germplasm before diagnostic methods were developed (6,18,29,31). Resistance to SCYLV has been shown to occur in sugarcane cultivars and it appears to be the most promising means to control the disease (31,34).

Sequence homology studies suggested that SCYLV arose by inter-species recombination between members of the genera *Luteovirus* and *Polerovirus* (24,32). SCYLV has therefore recently been assigned to the genus *Polerovirus* of the family *Luteoviridae* (8). The *Luteoviridae* have ssRNA genomes, reside in the phloem tissue of plants and are not transmitted mechanically

(13,22). SCYLV was transmitted successfully to healthy sugarcane plants by three aphid species that colonize sugarcane: *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* and *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Homoptera: Aphididae) (29,31). Transmission of *Luteoviridae* by these insects generally occurs in a persistent, circulative and non-replicative manner (12,13).

Several genetic diversity studies showed that SCYLV was a variable virus (1,5,23). Abu Ahmad and co-workers (1,2) described the occurrence and geographical distribution of four SCYLV genotype groups called genotypes BRA, CUB, PER, and REU. BRA-PER, a combined genotype that represents genotypes BRA and genotype PER that are relatively close phylogenetically (1) and that could not be differentiated by specific RT-PCR primers (2), is the most widespread. It was found in 18 different geographical locations all around the world. In contrast, genotypes CUB and REU were found in only four of 18 geographical locations. In most locations plants were infected by only one of these genotypes, but in others two or more genotypes were detected. Genotypes BRA-PER, CUB and REU were all found in Guadeloupe in locally bred cultivars, suggesting local transmission of all three genotypes. Genotypes BRA-PER and REU were found in Réunion Island, but REU was the only one that was detected in locally bred and commercially grown cultivars.

The objective of this study was to investigate the biological significance of the occurrence of different genotypes of SCYLV, with special emphasis on infection capacity (based on transmission and infection rate) and virulence (capacity to cause leaf symptoms) of the virus. SCYLV genotypes BRA-PER, CUB and REU in Guadeloupe and genotypes BRA-PER and REU in Réunion Island were transmitted locally via *M. sacchari* to in vitro tissue-cultured plants of eight sugarcane cultivars differing in resistance to infection by SCYLV and resistance to yellow leaf. Inoculated plants were then transferred to Montpellier/France and grown in a greenhouse to analyze efficiency of transmission in a vector-free environment. Analysis of incidence of the different SCYLV genotypes in the eight sugarcane cultivars showed the existence of different strains within this virus species.

MATERIAL AND METHODS

Production of SCYLV-free tissue-cultured sugarcane plantlets. Cuttings of eight sugarcane cultivars differing in resistance to infection by SCYLV or to yellow leaf were

imported to Montpellier (Table 1). These varieties were grown in pots in a greenhouse and meristem cultures were prepared as previously described (6). Tissue-cultured plantlets were grown and propagated at 28°C in 200 x 25 mm tubes with 12-h photoperiod, and tested for absence of SCYLV by RT-PCR after total RNA purification as described below. SCYLV-free plantlets were then transferred in sterile tubes (10 plantlets per tube) to Guadeloupe and Réunion Island for transmission experiments. Before inoculation with SCYLV, each plantlet was transferred to fresh growth medium and in a single 115 x 30 mm polypropylene tube.

Inoculum sources of SCYLV genotypes. Sugarcane stalks infected by the different SCYLV genotypes and healthy control stalks were sampled in the field. Cuttings from these stalks were grown in pots in greenhouses. To avoid cross contaminations, plants infected by different virus genotypes were either grown in insect-proof cages in the same greenhouse (Guadeloupe) or in different greenhouses (Réunion Island). Sugarcane cultivars B37-161, B86-409 and R570 infected with SCYLV genotypes BRA-PER, CUB and REU, respectively, were used as inoculum sources in Guadeloupe. Sugarcane cultivar "SP71-6163" (mislabeled cultivar)(2) infected by SCYLV genotype BRA-PER or by a mixture of BRA-PER and REU, and cultivar R577 infected by genotype REU, were used as inoculum sources in Réunion Island. Genotype identification was performed by RT-PCR with genotype specific primers as described below. Additionally, SCYLV-free sugarcane cultivars B59-92 and R577 were used as healthy control plants in Guadeloupe and Réunion Island, respectively.

Sampling and rearing of *M. sacchari*. The SCYLV aphid vector *M. sacchari* was collected in Guadeloupe and Réunion Island from sugarcane plants that tested negative for SCYLV by TBIA. In order to obtain virus-free aphids, *M. sacchari* individuals were reared on healthy sugarcane leaves of cultivar B59-92 in Guadeloupe and cultivar R577 in Réunion Island. Rearing was performed with 2 to 4-month-old plants grown in pots and covered with insect-proof cages in Guadeloupe, whereas rearing was performed in glass tubes on detached leaf fragments in Réunion Island (Fig. 1). In Réunion Island, approximately 25-cm long leaf pieces were taken from the youngest fully emerged leaf of 2 to 4-month-old sugarcane plants grown in a greenhouse, and surface disinfested with an ethanol-soaked cloth under a laminar flow hood. Each leaf fragment was then gently folded, and the two extremities of the U-shaped leaf fragment were inserted in a 200 x 25 mm glass tube containing 20 ml of agar medium (15 g agar, 25 ppm propiconazole, 1 liter distilled water). Tubes were maintained on the bench in the

laboratory at 24°C for 2 to 3 weeks with a 12-h photoperiod. In both locations, newly born individuals from adult aphids were sampled and reared on new plants or detached leaves, and this procedure was performed for at least two consecutive aphid generations. To produce viruliferous aphids, virus-free stage four nymphs or adult aphids were reared for 3 to 5 weeks on entire virus-infected plants in a greenhouse in Guadeloupe, and for at least two consecutive generations in the laboratory on detached virus-infected sugarcane leaves in Réunion Island.

Aphid transmission assays. Viruliferous stage one to four nymphs of *M. sacchari* were taken from SCYLV-infected leaves, and transferred one by one to SCYLV-free tissue-cultured sugarcane plantlet using a paint brush. In each geographical location, 10 to 13 plantlets were inoculated per sugarcane cultivar and per SCYLV genotype, and 7 to 10 nymphs were deposited on the emerging leaves of each plantlet (Fig. 2). The same procedure was used with control plants but nymphs of *M. sacchari* were taken from SCYLV-free leaves. The nymphs were allowed to feed on the plantlets for a 48- to 72-h inoculation access period (IAP). Plantlets were then sprayed in the polypropylene tube with an insecticide (100 ppm of imidacloprid per liter). Within one week after the transmission assays, inoculated sugarcane plantlets were transferred to Montpellier and to a growth chamber. Plantlets were grown for one month in 7 x 7 x 6.5-cm pots containing peat moss and compost (1:1, vol/vol), and then transferred to a quarantine glasshouse in 11 x 11 x 12 cm pots containing the same culture medium. After one month of growth in the quarantine glasshouse, plants were transferred to 5-liter pots containing a mixture of peat moss, compost and volcanic rock (2:2:1, vol/vol/vol) and grown in a regular greenhouse for another 4 months. Plants were observed for symptom development (yellowing of the leaf midrib, yellowing and necrosis of the leaf blade) every two weeks, and tested for SCYLV by TBIA and RT-PCR without RNA purification 5 to 6 months after inoculation as described below. The aphid transmission experiment was first performed in Guadeloupe, and the second experiment in Réunion Island 3 weeks later.

Experimental design in the greenhouse in Montpellier. Plants inoculated with SCYLV in Guadeloupe and in Réunion Island were grown separately in two adjacent greenhouses. In each greenhouse, plants of each cultivar x SCYLV genotype combination were divided arbitrarily into two groups and each group was distributed in one of two adjacent blocks.

Detection of SCYLV in sugarcane by tissue blot immunoassay (TBIA). TBIA with the youngest fully emerged leaf was performed as described by Schenck et al. (30), except that

Fast Blue BB salt (Sigma®) was used. Membranes were analyzed with a stereomicroscope (x 100) to determine positive reactions.

Detection of SCYLV in sugarcane by RT-PCR with RNA purification. Total RNA from the youngest fully emerged leaf was extracted and purified from sugarcane leaves (100 mg of lamina and midrib) with the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total RNA was eluted in a final volume of 40 µl of diethylpyrocarbonate-treated (DEPC) water and stored at -20 °C. RT-PCR was performed using the Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences): 46 µl of DEPC water, 1 µl of each primer YLS111 and YLS462 (10 µM) (1) and 2 µl of eluted RNA were added to each reaction tube. The RT-PCR program was 45°C for 45 min, 95°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final 72°C extension step for 10 min. The amplified fragment from the coat protein coding sequence had an expected size of 351 bp. This detection method was applied to all plants that were further used for SCYLV genotype identification.

Detection of SCYLV in sugarcane by RT-PCR without RNA purification. Total RNA was extracted from the midrib of the youngest fully emerged leaf of sugarcane plants. Each midrib fragment (50 mg) was deposited in a 2-ml tube containing two steel bullets (3 mm diameter). The sample was frozen by immersion of the tube for 30 s in liquid nitrogen, and then homogenized with the Retsch MM301 extractor (Fisher Bioblock Scientific) for 3 x 30 s. Five-hundred µl of carbonate coating buffer [2% (wt/vol) PVP-40, 1% (wt/vol) Na₂SO₃] were added to each tube that was centrifuged at 8800 rpm for 5 min, and the supernatant was stored at 4°C. For RT-PCR assay, 25 µl of extracted RNA was incubated overnight at 4°C in 200-µl microcentrifuge tubes. These tubes were washed two times with phosphate buffered saline (PBS)-Tween 20 and once with DEPC water. RT-PCR was performed using the Titan One Tube RT-PCR System kit (Roche). The 25-µl RT-PCR mix consisted of 5 µl RT-PCR buffer (5x), 1.25 µl DTT solution (100 mM), 0.25 µl RNase inhibitor (40 U µl⁻¹), 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 0.5 µl Titan enzyme mix, 0.1 µl of each primer YLS111 and YLS462 (100 µM) (1), and DEPC water to final volume. The RT-PCR program was 54°C for 60 min, 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 15 s, 61°C for 2 min and 68°C for 2 min, and a final 68°C extension step for 10 min. This RT-PCR method was applied to detect SCYLV in all inoculated plants grown in the greenhouse in Montpellier that tested negative by TBIA.

Detection of SCYLV in aphids. Total RNA of three to five pooled aphids was extracted

and purified with the RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) using the manufacturer's protocol. Total RNA was eluted in a final volume of 40 µl of DEPC water and stored at -20°C. RT-PCR with diagnostic primers YLS111 and YLS462 was performed using the Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) as described above.

SCYLV genotype identification. SCYLV genotypes were identified by RT-PCR using specific primers as described by Abu Ahmad et al. (2). The genotype was determined in each plant used as inoculum source. Two samples of three to five aphids per inoculum source were used to identify the SCYLV genotypes(s) in insects reared on entire plants or detached leaves. At least two infected plants from each sugarcane cultivar x inoculum combination were used in each transmission trial, except when infected plants were not available.

Statistical analyses. The logit [$\log(p/(1-p))$] of the infection probability p was analyzed for the sugarcane cultivars and the SCYLV genotypes. The generalized linear model was used (21), and the number x_{ij} of infected plants of sugarcane cultivar i and virus genotype j was distributed as a binomial $B(n_{ij}; p_{ij})$. The logit of p_{ij} expectation was written as the linear model

$$\log\left(\frac{p_{ij}}{1-p_{ij}}\right) = \mu + \alpha_i + \beta_j \text{ where } \alpha_i \text{ was the effect of sugarcane cultivar } i \text{ and } \beta_j \text{ the effect of}$$

SCYLV genotype j . The generalized linear model was performed with Genmod procedure of SAS software release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Quality of adjustment was tested with Pearson's Chi-square test to evaluate the need of an over-dispersion parameter (ϕ adjusted on Pearson's Chi-square statistic) in comparison to the binomial distribution. This over-dispersion could also be considered as a cultivar x genotype interaction. The sugarcane cultivar and virus genotype effects were tested by the Chi-square test when the model was a good fit. These two effects were tested by the Fisher-Snedecor (F) test when a multiplicative over-dispersion was found, and incidences of virus genotypes were then compared for each sugarcane cultivar with Fisher's exact test.

The logit model could not be applied to symptomatic plant data because the number of symptomatic plants was low or nil for several sugarcane cultivars and for SCYLV genotype REU. For this reason, the symptomatic plant data were analyzed with Fisher's exact test using the proc Freq procedure of SAS software release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Cumulated average numbers of symptomatic plants were analyzed separately for the sugarcane cultivars and the SCYLV genotypes. Pairwise comparisons of sugarcane cultivars and of SCYLV genotypes

were also performed with Fisher's exact test.

RESULTS

Presence of SCYLV in sugarcane plants and aphids used for transmission of the virus. SCYLV was detected and the virus genotype determined in all plants used for *M. sacchari* rearing (Tables 2-5). The virus was also found by RT-PCR in the 12 pooled aphid samples that were taken arbitrarily among the reared insect populations. The genotypes of SCYLV present in these aphids were identical to the virus genotypes present in the plants on which the aphids were reared. The virus was not detected in the healthy control plants and in the aphids reared on these plants.

SCYLV transmission efficiency. Ten to 13 tissue-cultured plantlets were inoculated for each sugarcane cultivar x SCYLV genotype combination in Guadeloupe and in Réunion Island (with the exception of control plants of cultivars CC84-75, CC85-68, CC85-92 and H78-3567 that were not available in Réunion Island). Because some plantlets failed to grow after transfer from the glass tube to the greenhouse, the final number of inoculated plants varied from two to 13 (Tables 2-5). SCYLV was detected by TBIA in 86 (39%) of 218 plants inoculated in Guadeloupe, 5 and 6 months after plant inoculation. Additionally, 20 TBIA negative plants tested positive by RT-PCR 6 months after inoculation, and a total of 106 (49%) of 218 plants were found infected by the virus. SCYLV was detected by TBIA in 39 (22%) and in 41 (23%) of 175 plants inoculated in Réunion Island, 5 and 6 months after plant inoculation, respectively. Additionally, 35 TBIA negative plants tested positive by RT-PCR 6 months after inoculation, and a total of 76 (43%) of 175 plants were found infected by the virus.

Infection data 6 months after inoculation were analyzed statistically. No data correction was needed to take into account a sugarcane cultivar x virus genotype interaction for the transmission trial performed in Guadeloupe (over-dispersion parameter $\phi = 1.15$, $P = 0.3105$), and the cultivar and genotype effects were significant at $P < 0.0001$ and $P = 0.0077$, respectively (Table 2). In contrast, over-dispersion parameter was needed for the transmission trial performed in Réunion Island ($\phi = 3.33$, $P < 0.0001$), and no significant sugarcane cultivar or SCYLV genotype effect was found ($P = 0.2866$ and $P = 0.3042$, respectively). The over-dispersion of these latter data compared to a binomial distribution of infected plants was attributed to a

sugarcane cultivar x virus genotype interaction in this trial, and this interaction was evident for several cultivars, especially for cultivars H78-4153 and R570 (Table 3).

In Guadeloupe, transmission rate of SCYLV genotype CUB (62% of infected plants) was higher than transmission rates of genotypes BRA-PER (47%) and REU (39%) that were not significantly different (Table 2). In Réunion Island, transmission rate of genotypes BRA-PER (56%) and REU (33%) were not significantly different either, but this result may have been biased by the over-dispersion of data (Table 3). Transmission rate of genotype mixture BRA-PER + REU (42%) was not different from the transmission rates of genotypes BRA-PER and REU transmitted separately.

Variation in SCYLV infection capacity. SCYLV genotype BRA-PER was detected in at least two of 10 inoculated plants of all eight sugarcane cultivars in Guadeloupe and Réunion Island. Similarly, genotype CUB was found in at least three of 10 inoculated plants of all eight sugarcane cultivars in Guadeloupe. None of the 40 plants of highly resistant sugarcane cultivars H78-3567 and H78-4153 inoculated with genotype REU in Guadeloupe and in Réunion Island was infected by this genotype 6 months after plant inoculation (Tables 2 and 3). In contrast, 13 of 32 plants of these two cultivars were infected by genotype BRA-PER.

SCYLV genotype REU was detected in six of nine plants of sugarcane cultivar R570 inoculated with this genotype in Guadeloupe (Table 2), whereas it was not found in any of the nine plants of sugarcane cultivar R570 inoculated with genotype REU in Réunion Island (Table 3). Additionally, the five plants of cultivar R570 infected by SCYLV after inoculation with the mixture of genotypes BRA-PER + REU were all infected by genotype BRA-PER only. Similarly, only genotype BRA-PER was detected in the SCYLV positive plant of cultivar H78-4153 inoculated with this genotype mixture. Genotypes BRA-PER and REU were detected in the SCYLV infected plants of all the other sugarcane cultivars.

Variation in SCYLV virulence based on disease symptoms. Symptoms of leaf yellowing were observed first in the greenhouse 3 months after inoculation of plants with SCYLV. At the end of the experiments (6 months after plant inoculation), 31 (14%) of 218 plants inoculated in Guadeloupe and 29 (17%) of 175 plants inoculated in Réunion Island exhibited disease symptoms (Tables 4 and 5). Genotypes BRA-PER, CUB and REU incited symptoms in 11 of 73 (15%), 17 of 68 (25%) and three of 77 (4%) plants inoculated in Guadeloupe, respectively. Genotype BRA-PER, the mixture of genotype BRA-PER and REU,

and genotype REU incited symptoms in 14 of 57 (25%), 15 of 55 (27%) and 0 of 63 (0%) plants inoculated in Réunion Island, respectively. Highly significant sugarcane cultivar ($P < 0.0001$) and SCYLV genotype ($P < 0.0015$) effects were found in both experiments, and the percentage of symptomatic plants inoculated with genotype BRA-PER was higher than the percentage of symptomatic plants inoculated with genotype REU (Tables 4,5). None of the 103 control plants exhibited yellow leaf symptoms. Four plants of highly susceptible sugarcane cultivars H50-7209 and SP71-6163, inoculated with SCYLV genotype BRA-PER in Guadeloupe, showed disease symptoms (Table 4) although the virus was not detected in these plants (Table 2). Similarly, one plant of susceptible cultivar CC84-75 inoculated with genotype BRA-PER, and three plants of highly susceptible cultivar H50-7209 inoculated with mixed genotypes BRA-PER and REU in Réunion Island, showed yellow leaf symptoms (Table 5) although the virus was not detected in these plants (Table 3).

No plant of highly resistant cultivars H78-3567, H78-4153 and tolerant cultivar R570 exhibited disease symptoms, whatever the SCYLV genotype and the geographical location where the plants were inoculated. Genotype BRA-PER from Guadeloupe incited symptoms in highly susceptible sugarcane cultivars H50-7209 and SP71-6163 (Table 4). Genotype BRA-PER from Réunion Island, alone or in mixture with genotype REU, incited symptoms in the same cultivars and in three additional cultivars (Table 5).

Variation in sugarcane resistance to infection by SCYLV. The percentage of plants infected by SCYLV varied between 22% (resistant cultivar H78-3567 and highly resistant cultivar H78-4153) and 68% (highly susceptible cultivars CC84-75 and SP71-6163) in the transmission experiment performed in Guadeloupe (Table 2), and between 10% (resistant cultivar H78-3567) and 71% (highly susceptible cultivar CC85-68) in the transmission experiment performed in Réunion Island (Table 3). Percentage of infected plants of resistant cultivar H78-3567 and highly resistant cultivar H78-4153 were different from percentage of infected plants of cultivars CC84-75 (highly susceptible), CC85-68 (highly susceptible), CC85-92 (resistant), R570 (unknown resistance to infection) and SP71-6163 (highly susceptible), but not from cultivar H50-7209 (resistance to infection unknown but highly susceptible to yellow leaf) in the transmission experiment performed in Guadeloupe (Table 2). No significant differences of infection percentages were found between sugarcane cultivars in the transmission experiment performed in Réunion Island (Table 3), but this result may have been biased by the

over-dispersion of data and existence of a sugarcane x cultivar interaction in this trial (Table 3). In this experiment, as shown above, plants of sugarcane cultivars H78-3567, H78-4153 and R570 were infected by SCYLV genotype BRA-PER but not by genotype REU.

Variation in sugarcane resistance to yellow leaf. The percentage of plants showing disease symptoms varied between 0% (sugarcane cultivar CC85-92 whose resistance to yellow leaf is unknown, resistant sugarcane cultivars H78-3567 and H78-4153, and tolerant cultivar R570) and 52% (highly susceptible cultivar SP71-6163) in the transmission experiment performed in Guadeloupe (Table 4), and between 0% (resistant sugarcane cultivars H78-3567 and H78-4153, and tolerant cultivar R570) and 62% (highly susceptible cultivar H50-7209) in the transmission experiment performed in Réunion Island (Table 5).

DISCUSSION

In this study, two different rearing methods and an unusual plant inoculation method were used successfully to transmit SCYLV from diseased to healthy sugarcane plants. Rearing *M. sacchari* aphids on infected sugarcane plants has been described and used for SCYLV transmission by several authors (18,29,31), but this is the first report of rearing *M. sacchari* on detached sugarcane leaves in the laboratory. Additionally, in vitro inoculation of tissue-cultured sugarcane plantlets allowed us to inoculate eight sugarcane cultivars with different SCYLV isolates in two geographical locations (Guadeloupe and Réunion Island), and to study inoculated plants in a single environment (Montpellier) with almost no risk of subsequent cross-contamination between plants. Indeed, *M. sacchari* does not exist in mainland France and the only putative vector of SCYLV existing on maize in the South of France, *Rhopalosiphum maidis*, does not colonize sugarcane in our local conditions (G. Labonne, unpublished results).

Several differences observed between SCYLV isolates or genotypes suggested variation in infection capacity and virulence of this virus. Percentage of infected and symptomatic plants inoculated with SCYLV genotype CUB was higher than the percentage of infected plants inoculated by genotypes BRA-PER or REU. This difference must, however, be confirmed by additional experiments in Guadeloupe because genotype CUB has not been found in Réunion Island (2). No difference in overall transmission rate was found by statistical analysis between SCYLV genotypes BRA-PER and REU in the experiments performed in Guadeloupe and in Réunion Island. However, variation in infection capacity and virulence based on sugarcane

infection and disease symptom development, respectively, was observed between these two genotypes. Whereas sugarcane cultivars H78-3567 and H78-4153 were successfully inoculated with SCYLV genotype BRA-PER in Guadeloupe and in Réunion Island, the virus was never detected in plants of these two cultivars inoculated with genotype REU. This sugarcane cultivar x SCYLV genotype interaction is proof that genotypes BRA-PER and REU are two strains of SCYLV.

Additionally, virulence of genotype REU varied according to the geographical origin of the members of this virus group. Genotype REU was transmitted successfully to sugarcane cultivar R570 in Guadeloupe, but transmission failed in Réunion Island with two different inoculum sources of the pathogen: genotype REU was not detected in plants of cultivar R570 inoculated in Réunion Island with this genotype alone or with a mixture of genotypes BRA-PER and REU. The failure of transmission of SCYLV genotype REU to sugarcane cultivar R570 in Réunion Island may explain why incidence of the virus did not significantly vary in a recent three-year survey of several R570 fields in this geographical location (28). Similar results were obtained recently in Colombia where a SCYLV isolate was transmitted successfully via *M. sacchari* to several sugarcane cultivars, except to healthy plants of the sugarcane cultivar from which it originated (J. Victoria, pers. communication).

The failure of transmission of SCYLV genotype REU to sugarcane cultivar R570 suggests that this virus genotype evolved in Réunion Island during the last decades because sugarcane cultivar R570 was created in 1964 by CERF in Réunion Island and plants of cultivar R570 infected by SCYLV genotype REU exist in this geographical location. Further investigations will be necessary to identify the genetic origin of this pathogenic variation in SCYLV genotype REU.

The number of symptomatic plants was not related to plant infection and 122 of 182 plants infected by SCYLV did not exhibit disease symptoms, thus confirming previous field observations (16,29,33). However, differences in number of symptomatic plants confirmed conclusions based on infection data. Genotype REU caused almost no symptoms in the plants inoculated with this genotype in Guadeloupe and Réunion Island, whereas 15 to 25% of plants inoculated with genotype BRA-PER were symptomatic. SCYLV genotype BRA-PER is therefore a more aggressive strain than genotype REU. Pathogenicity variation within genotype BRA-PER may also exist because this genotype from Réunion Island caused symptoms in more

varieties than the same genotype from Guadeloupe. These results must, however, be confirmed by additional or repeated data. Additionally, SCYLV was not detected in several plants showing yellow leaf symptoms but inoculated with SCYLV genotype BRA-PER. These symptoms were therefore caused by virus populations of this genotype not detected by TBIA and RT-PCR, or by an undetermined physiological disorder.

In Hawaii, sugarcane cultivar H78-4153 is highly resistant to infection by SCYLV (31). In this geographical location, cultivar H78-4153 remained virus-free in SCYLV contaminated fields over a 1-year period of observation, and all aphid-inoculated plants tested negative for SCYLV (31). In contrast, in this study, cultivar H78-4153 was infected by genotype BRA-PER in Réunion Island and in Guadeloupe, and also by genotype CUB in Guadeloupe. These differences in transmission efficiency may be additional evidence for variation in infection capacity of SCYLV or may be caused by variation in biotypes of *M. sacchari* in the different geographical locations. Virus transmission is correlated with host and environment adaptation in several aphid species (4,13,14,26). Additionally, several field populations or clones of *M. sacchari* differing in their ability to transmit SCYLV may exist, as it was shown for the aphids *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae* and transmission of different BYDV serotypes (9,20).

This study is the first report of a rearing method of *M. sacchari* on detached sugarcane leaves, efficient inoculation of tissue-cultured sugarcane plantlets with SCYLV and variation in infection capacity and virulence of SCYLV. Additional studies are needed to further investigate importance of SCYLV strains on a world-scale basis and to identify the genetic origin of this variation. Segregation for resistance exists in sugarcane progeny and resistance to infection by SCYLV appears a promising method to control yellow leaf (34). However, efficient screening of resistant sugarcane cultivars will have to take into account variation in infection capacity and virulence of SCYLV.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marie-Josée Darroussat, Rosiane Boisne-Noc, Magali Payet, Jean-François Bousquet, Emmanuel Fernandez, Rémy Habas and Marc Muller for technical assistance, Gérard Labonne, Jean-Michel Lett, Ben Lockhart, and Nicolas Sauvion for fruitful discussions and suggestions regarding aphid rearing, and Bernard Vercambre for *Melanaphis sacchari* aphid identification.

We also thank AIPSA (Peru), CENICAÑA (Colombia), CERF (Réunion Island), COPSUCAR (Brazil) and HARC (Hawaii) for supplying sugarcane cultivars used in this study, and Susan Schenck, Erik Mirkov and Jorge Victoria for critical reviewing of the manuscript. This research was conducted during the thesis scholarship program of Youssef Abu Ahmad, supported by the Government of Syrian Arabic Republic and CENICAÑA in Colombia.

LITERATURE CITED

1. Abu Ahmad, Y., Rassaby, L., Royer, M., Borg, Z., Braithwaite, K. S., Mirkov, T. E., Irej, M. S., Perrier, X., Smith, G. R., and Rott, P. 2006. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. *Arch. Virol.* 151:1355-1371.
2. Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J.-H., Costet, L., Lett, J.-M., Victoria, J. I., Girard, J.-C., and Rott, P. 2006. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Dis.* 90:1156-1160.
3. Alegria, O. M., Chatenet, M., Girard, J.-C., Saldarriaga, S. A., Nuget, A., and Rott, P. 2000. First report of *Sugarcane yellow leaf virus* in Peru. *Plant Dis.* 84:1342.
4. Anstead, J. A., Burd, J. D., and Shufran, K. A. 2002. Mitochondrial DNA sequence divergence among *Schizaphis graminum* (Hemiptera: Aphididae) clones from cultivated and non-cultivated hosts: haplotype and host associations. *Bull. Entomol. Res.* 92:17-24.
5. Borg, Z., Moonan, F., Braithwaite, K., Mirkov, T. E., and Smith, G. 2001. Characterising the genetic diversity of sugarcane yellow leaf virus. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* 24:654-656.
6. Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irej, M., Lockhart, B. E. L., and Rott, P. 2001. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis.* 85:1177-1180.
7. Comstock, J. C., Irej, M. S., Lockhart, B. E. L., and Wang, Z. K. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane* 4:21-24.
8. D'Arcy, C. J., and Domier, L. L. 2005. *Luteoviridae*. Pages 891-900 in: *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. C. M. Fauquet,

- M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds. Elsevier Academic Press, London.
9. Dedryver C.-A., Riault, G., Tanguy, S., Le Gallic, J. F., Trottet, M., and Jacquot, E. 2005. Intra-specific variation and inheritance of BYDV-PAV transmission in the aphid *Sitobion avenae*. Eur. J. Plant Pathol., 111:341-354.
 10. Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, M. E., de Armas, R., Rodríguez, C. W., Martinez, M., Piñón, D., Acevedo, R. and Solas, M. T. 2003. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. Plant Physiol. Biochem. 41:1027-1036.
 11. Gonçalves, M. C., Vega, J., Olivieira, J. G., and Gomes, M. A. 2005. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. Fitopatol. Bras. 30:10-16.
 12. Gray, S. M., and Banerjee, N. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:128-148.
 13. Gray, S., and Gildow, F. E. 2003. Luteovirus-aphid interactions. Ann. Rev. Phytopathol. 41:539-566.
 14. Gray, S. M., Smith, D. M., Barbierri, L., and Burd, J. 2002. Virus transmission phenotype is correlated with host adaptation among genetically diverse populations of the aphid *Schizaphis graminum*. Phytopathology 92:970-975.
 15. Grisham, M. P., Pan, Y.-B., Legendre, B. L., Godshall, M. A., and Eggleston, G. 2001. Effect of sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 24:434-438.
 16. Grisham, M. P., Pan, Y. B., White, W. H., Godshall, M. A., Legendre, B. L., and Comstock, J. C. 2002. Potential effect of yellow leaf syndrome on the Louisiana sugarcane industry. J. Am. Soc. Sugar Cane Technol. 22:125-126.
 17. Izaguirre-Mayoral, M. L., Carballo, O., Alceste, C., Romano, M., and Nass, H. A. 2002. Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcane in Venezuela. J. Phytopathol. 150:13-19.
 18. Lehrer, A. T., Schenck, S., Fitch, M. M. M., Moore, P. H., and Komor, E. 2001. Distribution and transmission of sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in Hawaii and its elimination from seedcane. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr. 24:439-443.

19. Lockhart, B. E. L., and Cronjé, C. P. R. 2000. Yellow leaf syndrome. Pages 291-295 in: A Guide to Sugarcane Diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier.
20. Lucio-Zavaleta, E., Smith, D. M., and Gray, S. M. 2001. Variation in transmission efficiency among *Barley yellow dwarf virus*-RMV isolates and clones of the normally inefficient aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. *Phytopathology* 91:792-796.
21. McCullagh, P., and Nelder, J.A. 1989. Generalized Linear Models. Second Edition. Chapman and Hall, London.
22. Miller, W. A., and Rosochová, L. 1997. Barley yellow dwarf viruses. *Annu. Rev. Phytopathology* 35:167-190.
23. Moonan, F., and Mirkov, T. E. 2002. Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: Evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *J. Virol.* 76:1339-1348.
24. Moonan, F., Molina, J., and Mirkov, T. E. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virology* 269:156-171.
25. Moutia, J.-F. Y., and Saumtally, S. 2001. Diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in cane juice and the effect of hot water treatment on its control. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* 24:444-450.
26. Porter, D. R., Burd, J. D., Shufran, K. A., Webster, J. A. and Teetes, G. L. 1997. Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes: Selected by resistant cultivars or preadapted opportunists? *J. Econ. Entomol.* 90:1055-1065.
27. Rassaby, L., Girard, J.-C., Letourmy, P., Chaume, J., Irely, M. S., Lockhart, B. E. L., Kodja, H., and Rott, P. 2003. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:459-466.
28. Rassaby, L., Girard, J.-C., Lemaire, O., Costet, L., Irely, M. S., Kodja, H., Lockhart, B. E. L., and Rott, P. 2004. Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the Island of Réunion. *Plant Pathol.* 53:117-125.

29. Scagliusi, S. M., and Lockhart, B. E. L. 2000. Transmission, characterization, and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopathology* 90:120-124.
30. Schenck, S., Hu, J. S., and Lockhart, B. E. L. 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. *Sugar Cane* 4:5-8.
31. Schenck, S., and Lehrer, A. T. 2000. Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Dis.* 84:1085-1088.
32. Smith, G. R., Borg, Z., Lockhart, B. E. L., Braithwaite, K. S., and Gibbs, M. J. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* 81:1865-1869.
33. Vega, J., Scagliusi, S. M. M., and Ulian, E. C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis.* 81:21-26.
34. Victoria, J. I., Avellaneda, M. C., Angel, J. C., and Guzmán, M. L. 2005. Resistance to *Sugarcane yellow leaf virus* in Colombia. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* 25:664-670.
35. Viswanathan, R. 2002. Sugarcane yellow leaf syndrome in India: Incidence and effect on yield parameters. *Sugar Cane Intern.* 20:17-23.

Table 1. Sugarcane cultivars used for transmission of different genotypes of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV)

Sugarcane cultivar	Imported from	Resistance level to infection by SCYLV ^a	Resistance level to yellow leaf ^b
CC84-75	Colombia	Highly susceptible (34)	Susceptible ^c
CC85-68	Colombia	Highly susceptible (34)	Unknown ^c
CC85-92	Colombia	Resistant (34)	Unknown ^c
H50-7209	Peru	Unknown	Highly susceptible (3)
H78-3567	Hawaii	Resistant (31)	Resistant (31)
H78-4153	Hawaii	Highly resistant (31)	Resistant (31)
R570	Réunion Island	Unknown	Tolerant (27,28)
SP71-6163	Brazil	Highly susceptible ^d	Highly susceptible (19)

^a Based on experimental data

^b Based on leaf yellowing in the field or yield data

^c J. Victoria (pers. communication)

^d J.-H. Daugrois (unpublished results)

Table 2. Incidence of three *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) genotypes after transmission to eight sugarcane cultivars in Guadeloupe

Sugarcane cultivar (resistance level to infection by SCYLV)	SCYLV genotype (Sugarcane host cultivar)				Total (%) except control ^x
	Control (B59-92)	BRA-PER (B37-161)	CUB (B86-409)	REU (R570)	
CC84-75 (HS) ^y	0/8 ^z	7/10	6/7	4/8	17/25 (68%) a
CC85-68 (HS)	0/9	5/9	7/10	5/10	17/29 (59%) a
CC85-92 (R)	0/10	4/7	5/10	4/10	13/27 (48%) a
H50-7209 (Unknown)	0/10	3/10	5/8	4/8	12/26 (46%) a,b
H78-3567 (R)	0/9	2/10	4/9	0/9	6/28 (22%) b
H78-4153 (HR)	0/7	4/9	3/10	0/13	7/32 (22%) b
R570 (Unknown)	0/4	5/9	6/8	6/9	17/26 (65%) a
SP71-6163 (HS)	0/11	4/9	6/6	7/10	17/25 (68%) a
Total ^x (%)	0/68 (0%)	34/73 b (47%)	42/68 a (62%)	30/77 b (39%)	

^x Values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to the Chi-square pairwise test (data of control plants were not included in the statistical analysis).

^y HS = highly susceptible, R = resistant, HR = highly resistant (see Table 1).

^z Number of SCYLV infected plants/total number of inoculated plants; infected plants reacted positively by TBIA or RT-PCR 6 months after plant inoculation.

Table 3. Incidence of two *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) genotypes after transmission to eight sugarcane cultivars in Réunion Island

Sugarcane cultivar (resistance level to infection by SCYLV)	SCYLV genotype (Sugarcane host cultivar)				Total (%) except control	Fisher's exact test <i>P</i> value ^w
	Control (R577)	BRA-PER ("SP71-6163") ^y	BRA-PER + REU ("SP71-6163")	REU (R577)		
CC84-75 (HS) ^x	-	2/10 ^y	-	2/4	4/14 (29%)	0.5205
CC85-68 (HS)	-	5/10	10/10	7/11	22/31 (71%)	0.0308
CC85-92 (R)	-	7/10	2/10	7/9	16/29 (55%)	0.0323
H50-7209 (Unknown)	0/8	2/2	3/6	3/5	8/13 (62%)	0.7669
H78-3567 (R)	-	2/5	0/7	0/9	2/21 (10%)	0.0476
H78-4153 (HR)	0/10	5/8	1 ^z /9	0/8	6/25 (24%)	0.0115
R570 (Unknown)	0/8	3/3	5 ^z /8	0/9	8/20 (40%)	0.0007
SP71-6163 (HS)	0/9	6/9	2/5	2/8	10/22 (45%)	0.3044
Total ^w	0/35	32/57	23/55	21/63		
(%)	(0%)	(56%)	(42%)	(33%)		

^y Mislabeled sugarcane cultivar (2).

^w No overall significant differences were found between sugarcane cultivars and SCYLV genotypes according to the Fisher Snedecor (F) test at $P = 0.05$ (data of control plants were not included in the statistical analysis). However, significant sugarcane cultivar x virus genotype interaction was found with the over-dispersion test, and virus effect for each cultivar was determined by the P value of Fisher's exact test.

^x HS = highly susceptible, R = resistant, HR = highly resistant (see Table 1).

^y Number of SCYLV infected plants/total number of inoculated plants; infected plants reacted positively by TBIA or RT-PCR 6 months after plant inoculation.

^z Plants infected by SCYLV genotype BRA-PER only; infected plants of all other sugarcane cultivars inoculated with genotype mixture BRA-PER + REU were infected by the two genotypes.

Table 4. Number of symptomatic plants of eight sugarcane cultivars inoculated with three *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes in Guadeloupe

Sugarcane cultivar (resistance level to yellow leaf)	SCYLV genotype (Sugarcane host cultivar)				Total (%) except control ^x
	Control (B59-92)	BRA-PER (B37-161)	CUB (B86-409)	REU (R570)	
CC84-75 (S) ^y	0/8 ^z	0/10	4/7	0/8	4/25 (16%) b
CC85-68 (Unknown)	0/9	0/9	3/10	0/10	3/29 (10%) b,c
CC85-92 (Unknown)	0/10	0/7	0/10	0/10	0/27 (0%) c
H50-7209 (HS)	0/10	5/10	5/8	1/8	11/26 (42%) a
H78-3567 (R)	0/9	0/10	0/9	0/9	0/28 (0%) c
H78-4153 (R)	0/7	0/9	0/10	0/13	0/32 (0%) c
R570 (T)	0/4	0/9	0/8	0/9	0/26 (0%) b,c
SP71-6163 (HS)	0/11	6/9	5/6	2/10	13/25 (52%) a
Total ^x	0/68	11/73 a	17/68 a	3/77 b	
(%)	(0%)	(15%)	(25%)	(4%)	

^x Values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to Fisher's exact test (data of control plants were not included in the statistical analysis).

^y HS = highly susceptible, S = susceptible, T = tolerant, R = resistant (see Table 1).

^z Number of plants with yellow leaf symptoms/total number of inoculated plants.

Table 5. Number of symptomatic plants of eight sugarcane cultivars inoculated with two *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes in Réunion Island

Sugarcane cultivar (resistance level to yellow leaf)	SCYLV genotype (Sugarcane host cultivar)				Total (%) except control ^w
	Control	BRA-PER	BRA-PER + REU	REU	
	(R577)	(“SP71-6163”) ^v	(“SP71-6163”)	(R577)	
CC84-75 (S) ^x	-	3/10 ^y	-	0/4	3/14 (21%) a,b,c
CC85-68 (Unknown)	-	4/10	6/10	0/11	10/31 (32%) a
CC85-92 (Unknown)	-	1/10	1/10	0/9	2/29 (7%) b,c
H50-7209 (HS)	0/8	2/2	6/6	0/5	8/13 (62%) a
H78-3567 (R)	-	0/5	0/7	0/9	0/21 (0%) c
H78-4153 (R)	0/10	0/8	0/9 ^z	0/8	0/25 (0%) c
R570 (T)	0/8	0/3	0/8 ^z	0/9	0/20 (0%) c
SP71-6163 (HS)	0/9	4/9	2/5	0/8	6/22 (27%) a,b
Total ^w	0/35	14/57 a	15/55 a	0/63 b	
(%)	(0%)	(25%)	(27%)	(0%)	

^y Mislabeled sugarcane cultivar (2).

^w Values followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$ according to Fisher's exact test (data of control plants were not included in the statistical analysis).

^x HS = highly susceptible, S = susceptible, T = tolerant, R = resistant (see Table 1).

^y Number of plants with yellow leaf symptoms/ total number of inoculated plants.

^z Plants infected by SCYLV genotype BRA-PER only.

Figure captions

Figure 1. Rearing of the aphid *Melanaphis sacchari* on detached sugarcane leaves. **A.** Nymphs of *M. sacchari* on a sugarcane leaf fragment. **B.** U-shaped sugarcane leaf fragments in glass tubes.

Figure 2. Tissue-cultured plantlet inoculated with *Sugarcane yellow leaf virus*. Arrows indicate nymphs of *Melanaphis sacchari*.



Figure 1 – Abu Ahmad – Plant Disease

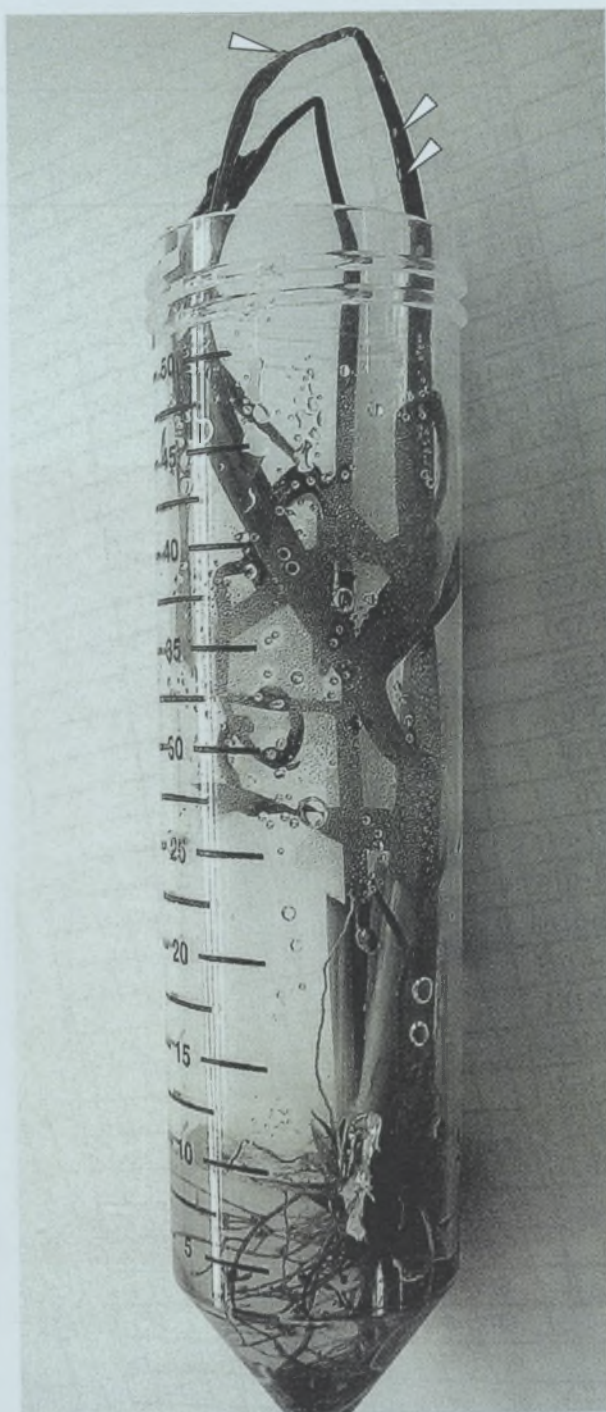


Figure 2 – Abu Ahmad – Plant Disease

CHAPITRE V
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au début de nos travaux sur la diversité génétique du SCYLV, peu d'informations étaient disponibles sur la variabilité du génome de ce virus. Le séquençage partiel de quelques isolats de SCYLV originaires du continent américain (Moonan & Mirkov, 2002) et des résultats d'hybridation moléculaire (Borg *et al.*, 2001) avaient permis de montrer que le génome du SCYLV pouvait varier en fonction de l'origine des isolats viraux. Par ailleurs, suite à l'étude réalisée par Rassaby en 2001, il s'est avéré que les gènes codant pour la protéine de capsid (ORF 3) et la protéine du mouvement (ORF 4) étaient très conservés chez ce virus. En revanche, des séquences partielles des gènes codant pour les ORFs 0, 1, 2 et 5 étaient relativement variables, suggérant l'existence de plusieurs génotypes du SCYLV, et notamment celle d'un génotype particulier à l'île de La Réunion. Au cours de cette thèse, nous avons poursuivi ces études en travaillant avec des séquences complètes du génome du SCYLV, afin de démontrer la présence de plusieurs génotypes du SCYLV et d'en préciser la distribution géographique. Etant donné qu'aucune information n'était disponible sur la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV, ni sur l'évolution moléculaire de ce virus, nous avons également essayé d'apporter de nouvelles connaissances scientifiques pour ces caractéristiques qui sont très liées à la variabilité des génomes viraux.

Les analyses phylogénétiques réalisées avec les séquences nucléotidiques et protéiques complètes des six ORFs de 14 isolats viraux du SCYLV ont permis de montrer que ces isolats étaient distribués dans quatre groupes phylogénétiques. Chacun de ces groupes représente un génotype viral, et ils ont été nommés génotypes BRA (pour Brésil), CUB (pour Cuba), PER (pour Pérou) et REU (pour Réunion). Cette dénomination est directement liée à la zone géographique où ils ont été identifiés pour la première fois. Les différences entre ces génotypes sont réparties sur l'ensemble des six ORFs du génome du SCYLV, à l'exception des ORFs 3 et 4 qui sont les régions les plus conservées, ce qui est aussi le cas chez le *Potato leafroll virus* (PLRV) (Guyader & GIBLOT-DUCRAY, 2002). Les régions correspondant aux ORFs 0, 1, 2 et 5 sont les plus variables, et la grande variabilité de l'ORF 0 (associé à la suppression de l'extinction post-transcriptionnelle de gène ou PTGS) pourrait être liée aux divers symptômes de jaunissement observés dans les différents pays producteurs de canne à sucre. La variabilité des ORFs 1 et 2 (impliqués dans la réplication du virus) et de l'ORF 5 (impliqué dans la vécion par les pucerons) pourrait aussi, quant à elle, être associée à une variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV.

En se basant sur les séquences nucléotidiques complètes du génome du SCYLV, le génotype BRA s'est avéré le plus variable et présent dans plusieurs zones géographiques

comme le Brésil, la Chine, la Colombie, l'Inde et les USA. Les génotypes PER et REU n'étaient représentés que par des isolats du Pérou et de La Réunion, respectivement. Le génotype CUB représenté par des isolats de Cuba et de Colombie s'est avéré comme étant le plus différent des autres génotypes, ce qui nous a finalement conduit à l'exclure de l'espèce SCYLV et de l'inclure dans une nouvelle espèce virale comme décrit ci-après. Dans le but de préciser la distribution géographique des quatre génotypes du SCYLV à l'aide de nombreux isolats viraux, des amorces permettant d'amplifier par RT-PCR un fragment unique du génome de chaque génotype ont été développées. Ces amorces se sont révélées efficaces pour différencier les quatre génotypes, à l'exception des génotypes BRA et PER qui sont relativement proches d'un point de vue phylogénétique et qui ont donc été regroupés sous le génotype mixte BRA-PER.

Le génotypage par RT-PCR de 245 isolats du SCYLV originaires de 18 pays et représentant l'Afrique, l'Amérique du Nord, Centrale et du Sud, et l'Asie, nous a permis de montrer que le génotype BRA-PER est largement présent dans toutes les zones de culture de la canne à sucre. Ce résultat est très certainement dû à la circulation active de matériel végétal infecté par le SCYLV avant la découverte de ce virus et la disponibilité de tests de diagnostic et de détection efficaces, notamment en quarantaine (Chatenet *et al.*, 2001). En revanche, les génotypes CUB et REU ont chacun été trouvés dans seulement quatre zones géographiques. Cette situation pourrait être liée i/ à la stabilité de ces deux génotypes dans les régions dans lesquelles ils existent, en raison d'une forte interaction génotype x environnement, ii/ à la propagation de ces génotypes par des clones particuliers et peu fréquents d'un insecte vecteur, iii/ à une forte spécificité de ces génotypes avec certaines variétés de canne à sucre qui n'ont pas ou peu circulé au niveau mondial, iv/ à une apparition récente de ces génotypes ; leur propagation aurait été stoppée grâce à la découverte du SCYLV et son interception lors du mouvement de matériel végétal. Par ailleurs, les génotypes REU et BRA-PER ont été trouvés tous les deux à l'île de La Réunion, mais seul le génotype REU est présent sur toute l'île et dans les variétés créées et cultivées localement. Le génotype BRA-PER est largement minoritaire à La Réunion car il n'y a été trouvé qu'occasionnellement, notamment en collection variétale dans une variété appelée « SP71-6163 ». Cette variété a été importée à La Réunion, mais son origine ne peut être précisée car il s'est avéré que la variété a été mal étiquetée comme cela a été démontré à l'aide d'analyses moléculaires (microsatellites). L'absence de propagation à ce jour du génotype BRA-PER à La Réunion pourrait être due à des conditions environnementales particulières de cette zone géographique ou à l'introduction trop récente de ce génotype sur l'île. De nouveaux génotypes du SCYLV dans quelques

années devraient permettre d'apporter des éléments de réponse à ces hypothèses. Une situation similaire existe au Brésil mais, dans ce pays, c'est le génotype BRA-PER qui est largement majoritaire et le génotype REU a seulement été détecté dans la variété réunionnaise R570 importée de La Réunion. En revanche, les trois génotypes BRA-PER, CUB et REU ont tous les trois été trouvés dans les variétés créées localement en Guadeloupe, ce qui prouve la transmission locale de ces génotypes via les pucerons vecteurs présents dans cette île, et notamment *Melanaphis sacchari*. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'interactions importantes entre les génotypes de SCYLV et leur environnement au sens large, et ces interactions restent à être élucidées.

Les analyses des séquences virales de nombreux isolats du SCYLV nous ont permis d'identifier des événements évolutifs importants dans l'histoire de ce virus. Des mutations importantes ont ainsi été découvertes : deux délétions [un codon de terminaison dans l'UTR intergénique et un acide aminé (Phe) dans l'ORF 5] existent dans toutes les séquences des isolats du génotype CUB. L'insertion d'un acide aminé (Cys) dans l'ORF 4 (lié au mouvement du virus dans la plante) a été notée pour l'isolat COL-YL1a appartenant aussi au génotype CUB. Par ailleurs, il a été noté la présence de codons de terminaison prématurés dans les ORFs 0 et 5 de certains isolats appartenant au génotype CUB. On peut émettre l'hypothèse que deux événements distincts sont à l'origine de ces types de mutation, et on peut se demander si elles confèrent ou non un avantage sélectif aux isolats concernés. La possession d'un génome plus court pourrait favoriser la vitesse de réplication du virus car il faut moins de temps pour copier une séquence plus courte (Guyader, 2003). Cependant, une de ces délétions est localisée dans une région importante et responsable de la transmission du virus, à savoir l'ORF 5. Cette mutation pourrait notamment affecter le taux de transmission du SCYLV par le puceron vecteur. Même si la présence du codon de terminaison peut, dans certaines circonstances, ne pas entraîner la fin de la synthèse de la protéine, une partie des ribosomes peut continuer la lecture et permettre ainsi l'expression fortement différenciée de deux cadres ouverts de lecture co-terminaux en 5' (Astier *et al.*, 2001). Dans d'autres situations, ces codons de terminaison pourraient favoriser la production de protéines plus petites.

Par ailleurs, des événements de recombinaison ont été détectés entre les génomes des quatre génotypes du SCYLV, notamment au sein des ORFs 1, 2 et 5 qui sont les régions les plus variables du génome viral. Ces événements de recombinaison ont aussi été trouvés au sein d'un même génotype, comme c'est le cas pour les isolats PER-YL1a et PER-YL1b du

génotype PER originaires du Pérou et pour les isolats BRA-YL1a et BRA-YL1b du génotype BRA originaires du Brésil.

Les méthodes statistiques d'analyse phylogénétique des séquences codantes du génome du SCYLV nous ont permis d'étudier les variations du taux de substitutions non synonymes sur synonymes (ω). Un premier type de modèle où ω varie entre les codons nous a permis de mettre en évidence l'action de la sélection positive sur certains acides aminés. Ce type de sélection agit en effet sur les trois ORFs chevauchantes du SCYLV (ORFs 0, 1, 2) et sur une non chevauchante (ORF 5). Les plus fortes valeurs de taux ω , correspondant à une sélection positive très forte, ont été observées pour les ORFs 0 et 1 (ω variant de 4 à 12 selon les modèles, alors qu'il varie entre 2 à 3 pour les ORFs 2 et 5). Respectivement 20, 25, 10 et 5 sites sous sélection positive ont été détectés. Les acides aminés concernés ne sont cependant pas répartis de manière homogène le long des ORFs mais semblent se concentrer sur les régions chevauchantes ORF 0/ORF 1 et ORF 1/ORF 2. Les ORFs 3 et 4 ne sont quant à eux pas soumis à sélection positive, bien qu'elles soient entièrement chevauchantes. Dans les régions chevauchantes, certaines substitutions non synonymes d'un codon sélectionné positivement dans le premier ORF entraînent dans l'autre ORF un changement d'acide aminé lui aussi sélectionné positivement.

Un deuxième type de modèle assumant des taux ω constants entre les codons des ORFs analysés nous a permis de mettre en évidence un différentiel important de pressions de sélection entre les ORFs du virus. Les taux ω élevés observés pour les ORFs 0, 1 et 2 sont probablement en grande partie expliqués par la présence de sites sous sélection positive, qui ont naturellement tendance à augmenter les taux ω moyens (Yang et Bielawski, 2000 ; Yang *et al.*, 2000). L'ORF 4 a cependant un fort taux ω (0.65) comparé à l'ORF 3 ($\omega = 0.32$), ces deux ORFs entièrement chevauchantes n'ayant aucun site sous sélection positive. Cette forte valeur s'expliquerait donc par des contraintes sélectives moindres sur l'ORF 4, codant la protéine de mouvement, que sur l'ORF 3 codant la protéine de capsid.

Par ailleurs, les comparaisons des taux ω entre branches, entre les génotypes REU, BRA et PER ont permis de révéler que le génotype PER a cependant des taux ω plus élevés (ORFs 2 et 5 notamment) que les génotypes REU et BRA (aucun autre virus proche servant de groupe externe au SCYLV n'a pu être aligné correctement et le génotype CUB étant le plus éloigné des trois autres génotype, il a été utilisé comme groupe externe à l'analyse). Cette augmentation relative du taux ω est soit due à de plus nombreux sites sous sélection positive, soit à un relâchement des pressions de sélection sur ce génotype par rapport aux autres. L'ORF 1 du génotype PER évolue 5 fois plus vite que celui des génotypes BRA et REU. Les

ORFs 2 et 5 du génotype BRA évoluent 2 et 1,5 fois plus vite que ceux des deux autres génotypes. Ces différences s'expliqueraient par la sélection positive sur les ORFs de ces génotypes ou, au contraire, concernent toutes les substitutions (synonymes et non synonymes) des ORFs. La variabilité du génome du SCYLV et l'existence de pressions de sélection positive confèrent au SCYLV des caractéristiques différentes de celles du PLRV qui est le représentant du genre *Polerovirus* et dont le génome est très stable (Guyader & GIBLOT-DUCRAY, 2002 ; Guyader, 2003). L'adaptation du SCYLV à la canne à sucre et à différentes variétés de cette plante hôte est peut être à l'origine de la sélection positive détectée ici. L'analyse des corrélations entre les variations d'acides aminés au sein des sites du génome du SCYLV soumis à sélection positive et les variations de virulence du virus entre isolats permettrait peut-être d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

L'analyse phylogénétique des séquences protéiques des six ORFs du génome de quatre isolats viraux représentant le génotype CUB nous a conduit à proposer la description d'une nouvelle espèce de virus. En effet, le pourcentage de diversité des séquences des ORFs 0, 1 et 5 des isolats COL-YL1a et COL-YL1b originaires de Colombie, et des isolats CUB-YL1a et CUB-YL1b originaires de Cuba, est supérieur à 20% avec les séquences de dix autres isolats du SCYLV. En revanche, ce pourcentage est inférieur à 9% pour l'ORF 2 et inférieur à 6% pour l'ORF 3. L'ORF 4 est très conservé entre ces isolats (seulement 3% environ de diversité entre isolats). Les règles du comité international de taxonomie des virus (ICTV) précisent qu'un minimum de 10% de diversité entre deux séquences d'un seul ORF chez deux isolats viraux de la famille des *Luteoviridae* est suffisant pour considérer que ces deux isolats constituent deux espèces virales différentes (D'Arcy & Domier 2005). En se basant sur cette définition, les isolats COL-YL1a et COL-YL1b originaires de Colombie et les isolats CUB-YL1a et CUB-YL1b originaires de Cuba n'appartiennent pas au SCYLV. Nous proposons donc d'assigner ces quatre isolats à une nouvelle espèce virale qui, en attendant d'être validée par le comité international de taxonomie des virus, a été nommée Sugarcane yellow leaf Cuba virus (SCYLCV).

La comparaison de plantes naturellement infectées au champ par différents génotypes du SCYLV et la comparaison de plantes inoculées en conditions contrôlées nous ont permis de montrer pour la première fois une variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV. Les deux génotypes BRA-PER et REU constituent deux souches différentes du SCYLV, et le génotype BRA-PER est plus agressif et plus virulent que le génotype REU. En effet, le génotype BRA-PER provoque des symptômes de jaunissement plus sévères que le génotype REU, et le génotype BRA-PER infecte plus de variétés de canne à sucre que le génotype REU. De plus,

une variabilité du pouvoir pathogène semble aussi exister à l'intérieur de chaque génotype. Cette variabilité n'est pas sans conséquence sur la circulation de matériel végétal et la sélection de variétés résistantes. En effet, même si un pays est déjà contaminé par le SCYLV, il faudra éviter d'y introduire un nouveau génotype viral qui pourrait s'y installer et provoquer des dégâts plus importants que le ou les génotypes déjà présents. Le passage des variétés de canne à sucre par des stations de quarantaine permettant d'assainir du matériel végétal contaminé est donc toujours plus que d'actualité (Chatenet *et al.*, 2001). Le criblage des variétés de canne à sucre pour leur résistance à la maladie de la feuille jaune, lorsqu'elle a lieu, n'est à ce jour réalisé que sous conditions d'infection naturelle au champ. Dans ces conditions, et lorsque les conditions de propagation du virus sont favorables, on peut supposer que la sélection naturelle est efficace. On peut cependant s'attendre à des variations du comportement des variétés de canne à sucre si de nouveaux génotypes sont introduits ou si les génotypes déjà présents évoluent. On notera également que les conditions environnementales semblent avoir des effets très importants sur l'évolution des populations virales *in planta*, une fois qu'une variété de canne à sucre est infectée par un isolat viral. La symptomatologie et la charge virale dans la feuille F1 apparaissent comme étant les paramètres les plus reproductibles pour mesurer les différences de pathogénie entre isolats du SCYLV infectant la même variété.

La vécution du SCYLV constitue aussi un élément déterminant de la pathogénie du SCYLV, et celle-ci peut avoir des répercussions dans la lutte contre la feuille jaune de la canne à sucre. Comme nous l'avons signalé précédemment, les génotypes BRA-PER ou REU ont été détectés uniquement de façon ponctuelle dans certaines zones géographiques. Cette propagation limitée peut être attribuée à une introduction récente des génotypes concernés, mais aussi à des capacités vectrices différentes des insectes vecteurs locaux. Chez d'autres *Luteoviridae* comme le BYDV-PAV, la transmission du virus a varié de 3,7% à 92,5% en fonction des clones du puceron vecteur, *Sitobion avenae* (de Dedryver *et al.*, 2005). Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences entre les pourcentages de transmission moyens des génotypes BRA-PER et REU à la Guadeloupe ou à La Réunion. En revanche, le pourcentage de transmission du génotype CUB (= SCYLCV) à huit variétés de canne à sucre était supérieur à ceux des génotypes BRA-PER et REU en Guadeloupe. Ce type de variation du taux de transmission pourrait être dû à des interactions spécifiques entre les génotypes viraux et les gènes de résistance de la plante hôte, mais aussi à des interactions entre le puceron et le virus. Ce dernier pourrait être plus ou moins bloqué par des barrières de l'insecte vecteur comme les glandes salivaires ou l'hémolymphe. Le passage du virus de l'hémolymphe

vers les glandes salivaires accessoires semble être la principale barrière déterminant la spécificité de transmission (Peiffer *et al.*, 1997). En effet, certaines souches non transmises peuvent être détectées dans l'hémolymphe, mais pas dans le canal salivaire (Hébrard *et al.*, 1999). L'efficacité de transmission de différents clones de *M. sacchari* ou d'autres pucerons vecteurs n'a pas été abordée au cours de nos travaux, mais elle constitue un élément clé de la variation de pathogénie du SCYLV qu'il faudra préciser dans le futur.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse nous ont permis d'apporter de nouvelles connaissances et de développer de nouveaux outils pour le pathosystème canne à sucre-SCYLV. La mise au point d'une méthode d'élevage du puceron *M. sacchari* au laboratoire sur des fragments de feuilles de canne à sucre détachées et l'efficacité des inoculations de la plante hôte cultivée *in vitro* permettront de standardiser les conditions d'étude de la maladie. Il sera ainsi possible de caractériser la résistance de la canne à sucre à l'égard du mouvement viral dans la plante hôte et en fonction des génotypes viraux dans un unique environnement sans risque de contamination par d'autres isolats du SCYLV. Des variations génétiques importantes ont été mises en évidence au sein du SCYLV et quatre génotypes (voire trois génotypes et une nouvelle espèce virale) ont été décrits. Etant donné les pourcentages d'identité variables observés pour les séquences partielles de certains isolats du SCYLV comme PHL1 ou MUS1 (Abu Ahmad *et al.*, 2006a), il est fortement probable que d'autres génotypes de SCYLV existent et restent à décrire. Le génome des isolats du SCYLV *a priori* les plus différents des génotypes déjà décrits devra donc être complètement séquencé et faire l'objet de nouvelles analyses phylogénétiques. Par ailleurs, le ou les génotypes de SCYLV n'ont pas encore été précisés dans tous les pays ou toutes les grandes zones géographiques contaminées par le SCYLV. Dans le cadre des études de l'évolution du SCYLV, agent causal d'une maladie émergente, il sera aussi indispensable de connaître les génotypes viraux présents dans les aires d'origine et de diversité de la canne à sucre et notamment en Chine, en Inde et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Grivet *et al.*, 2004). Le génotypage du virus dans ces aires de culture de la canne à sucre devra non seulement inclure les variétés cultivées, mais aussi les espèces sauvages apparentées à la canne à sucre et les ancêtres de cette plante. Les événements évolutifs de sélection et les événements de recombinaison dans l'évolution du SCYLV au sein de la famille des *Luteoviridae* pourront certainement être affinés à l'aide de ces nouvelles données. Par ailleurs, les infections mixtes du virus qui peuvent avoir lieu entre les différents génotypes ou souches du SCYLV ont probablement constitué (et constituent probablement toujours) un contexte favorable à une évolution vers de nouvelles espèces virales. La découverte de l'espèce SCYLCV en est un nouvel exemple dans la famille des

Luteoviridae. L'évolution du SCYLV est dépendante d'interactions impliquant à la fois le virus, la canne à sucre, et son vecteur. Chaque espèce de *Luteoviridae* est transmise par un vecteur spécifique, ce qui induit une pression de sélection importante sur les gènes impliqués dans le déterminisme de transmission persistante par le puceron (Lucio-Zavaleta *et al.*, 2001 ; Dedryver *et al.*, 2005). La sélection des espèces virales dans des plantes hôtes différentes (différentes variétés de canne à sucre pour le SCYLV) peut induire une évolution virale aussi importante que celle liée à une séparation géographique (Martin *et al.*, 1990).

S'il est à présent établi que différentes souches de SCYLV existent, ainsi qu'au moins deux espèces virales (SCYLV et SCYLCV) capables de provoquer la même maladie (la feuille jaune), le support génétique de ces variations de pathogénie reste à être identifié. Plusieurs approches pourraient être utilisées pour le préciser : i/ Comparaison de la séquence complète des isolats du génotype REU de la Guadeloupe et de La Réunion. Etant donné que ces deux isolats sont très proches d'un point de vue génétique (appartenance au même génotype), mais varient dans leur capacité à infecter la variété de canne à sucre R570, ils constituent un matériel biologique de choix. Les régions variables du génome seraient des candidats pour caractériser le ou les gènes jouant un rôle clé dans la transmission différentielle de ce génotype dans les deux sites géographiques. ii/ Mutagenèse dirigée dans les régions variables de chaque ORF. Ce travail permettrait non seulement l'identification des régions impliquées dans la variation du pouvoir pathogène du SCYLV, mais aussi de préciser le rôle de chacun des ORFs, car la fonction attribuée à chacun des ORFs du SCYLV n'est à ce jour que basée sur des analyses *in silico*. La caractérisation du pathosystème canne à sucre-SCYLV est donc loin d'être terminée, et sa poursuite devrait encore dévoiler de nombreuses connaissances scientifiques intéressantes à la fois en virologie végétale et dans la lutte contre la feuille jaune de la canne à sucre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES

- Abu Ahmad, Y., Rassaby, L., Royer, M., Borg, Z., Braithwaite, K. S., Mirkov, T. E., Ireby, M. S., Perrier, X., Smith, G. R., & Rott, P. 2006a. Yellow leaf of sugarcane is caused by at least three different genotypes of sugarcane yellow leaf virus, one of which predominates on the Island of Réunion. *Arch. Virol.* **151**(7):1355-71.
- Abu Ahmad, Y., Royer, M., Daugrois, J.-H., Costet, L., Lett, J.-M., Victoria, J. I., Girard, J.-C., & Rott, P. 2006b. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf* genotypes. *Plant Dis.* (accepted).
- Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traore, O., N'Guessan, P., Notteghem, J.-L., Kimmins, F., Konate, G. & Fargette D. 2003. Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *J. Gen. Virol.* **84**:733-743.
- Albiach-Martí, M. R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J. F. & Moreno, P. 2000. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathol.* **90**:134-138.
- Alegria, O. M., Chatenet, M., Girard, J.-C., Saldarriaga, S. A., Nuget, A., & Rott, P. 2000. First report of *Sugarcane yellow leaf virus* in Peru. *Plant Dis.* **84**:1342.
- Alexander, A. G. 1973. Sugar cane physiology. Elsevier Scientific Publishing Company, New-York, U. S., 752 p.
- Aljanabi, S., Parmessur, Y., Moutia, Y., Saumtally, S., & Dookun, A. 2001. Further evidence of the association of a phytoplasma and a virus with yellow leaf syndrome in sugarcane. *Plant Pathol.* **50**:628-636.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.
- Anon. 1995. Yellow leaf syndrome. Mauritius Sugar Industry Research Institute Annual Report 1995, p. 51.
- Anonyme. 2001. La phylogénie. Centre de ressources INFOBIOGEN, URL:<http://www.infobiogen.fr/doc/tutoriel/PHYLO/phylogenie.html>.
- Archie, J. W. 1989. A randomisation test for phylogenetic information in systematic data. *Syst. Zoo.* **38**:239-252.
- Arocha, Y., López, M., Fernández, M., Piñol, B., Horta, D., Peralta, E.L., Almeida, R., Carvajal, O., Picornell, S., Wilson, M. R., & Jones, P. 2005a. Transmission of a sugarcane yellow leaf phytoplasma by the delphacid plant hopper *Saccharosydne saccharivora*, a new vector of sugarcane yellow leaf syndrome. *Plant Pathol.* **54**:634-642.
- Arocha, Y., López, M., Piñol, B., Fernández, M., Picornell, B., Almeida, R., Palenzuela, I., Wilson, M. R., & Jones, P. 2005b. '*Candidatus* Phytoplasma graminis' and '*Candidatus* Phytoplasma

caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *Int J Syst Evol Microbiol.* **55**:2451-2463.

Ashoub, A., Rohde, W., & Prüfer, D. 1998. *In planta* transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res.* **26**:420-426.

Astier, S., Albouy, J., Maury, Y & Lecoq, H. 2001. Principes de virologie végétale : génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. INRA. Eds.

Atreya, P. L., Atreya, C. D., & Pirone, T. P. 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7887-7897.

Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. & Hay, R. T. 1990. Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon *in vivo*. *J. Gen. Virol.* **71**:2251-2256.

Benatti, L. B. 2004. Virus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar : caracterização da resposta fisiopatológica de tres variedades de cana-de-açúcar. Thèse de doctorat. Université de Estadual de Campinas. Brésil. (abstract). <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000342812>.

Bencharki, B., Mutterer, J., El Yamani, M., Ziegler-Graff, V., Zaoui, D. & Jonard, G. 1999. Severity of infection of Moroccan barley yellow dwarf virus PAV isolates correlates with variability in their coat protein sequences. *Ann. Appl. Biol.* **134**:89-99.

Blackburn, F. 1984. Sugar Cane. Tropical Agriculture. Longman Group, Harlow, U. K., 414 p.

Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virol.* **231**:141-147.

Blanc, S., Ammar, E. D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J., & Pirone, T. P. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* **79**:3119-3122.

Blanc, S., Hébrard, E., Drucker, M., & Froissart, R. 2001. Molecular basis of vector transmission: Caulimoviruses. Pages 143-166 in: *Virus- Insect-Plant Interactions*. K. Harris, O. P. Smith, and J. E. Duffus, eds. Academic Press, San Diego.

Borg, Z., Braithwaite, K. S., Whittle, P. J. L., Harding, R. M., Ireby, M. S. & Smith, G.R. 1997. Yellow leaf syndrome in Australia. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Pathol. Mol. Biol. Workshop*. Durban, South Africa.

Borg, Z., Gibbs, M., Lockhart, B., Braithwaite, K., & Smith, G. 1999. Sugarcane yellowleaf virus: a novel recombinant virus from the *Luteoviridae*. In: *Proc, XIth International Congress of Virology, Sydney 1999*. International Union of Microbiological Societies, Sydney, p 47 (VW15.02:47).

Borg, Z., Moonan, F., Braithwaite, K., Mirkov, T. E., & Smith, G. 2001. Characterising the genetic diversity of sugarcane yellow leaf virus. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* **24**:654-656.

Bork, P. & Gibson, T. J. 1996. Applying motif and profile searches. *Methods Enzymol.* **266**:162-183.

Borth, W., Hu, J. S., & Schenck S. 1994. Double-stranded RNA associated with sugarcane yellow

leaf syndrome. Sugar Cane 3:5-8.

Bouchery Y, 1977. Le puceron noir de la fève *Aphis fabae* Scop. (Homoptère *Aphididae*) en Alsace: fluctuations des populations sur féverole de printemps en relation avec les facteurs du milieu (température, pluviométrie, aphidiphages, plante-hôte). Ann. Zool. Ecol. Animal. 9:63-86.

Bourdin, D., Rouzé, J., Tanguy, S. & Robert, Y. 1998. Variation among clones of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Myzus nicotianae* Blackman in the transmission of a poorly- and a highly aphid-transmissible isolate of potato leafroll luteovirus (PLRV). Plant Pathol. 47:794-800.

Bousalem, M., Douzery, E. & Fargette, D. 2000. High genetic diversity, distant Phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. J. Gen. Virol. 81:243-255.

Brown, N. F., Wickham, M. E., Coombes, B. K., & Finlay, B. B. 2006. Crossing the Line: Selection and Evolution of Virulence Traits. PLoS Pathogens. 2:346-353.

Brandes, E.W., Sartoris, G.B., & Grassl, C.O. 1939. Assembling and evaluating wild forms of sugar cane and related plants. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. 6:128-153.

Brault, V., van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, H., Garaud, J.-C., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. Eur. Mol. Biol. Organ. J. 14:650-659.

Brault, V., Mutterer, J. D., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. 2000. Effects of point mutations in the readthrough domain of beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. J. Virol. 74:1140-1148.

Brault, V., Herrbach, E., Hauser, S., & Lemaire, O., 2001. Les *Luteoviridae* : Propriétés biologiques et évolution. Virologie. 5 (1):9-21.

Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K. E. & Ziegler-Graff, V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. J. Virol. 77:3247-3256.

Brault, V., Pérignon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K., Ziegler-Graff, V.. 2005. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. J. Virol. 79 (15):9685-9693.

Bujarski, J. J. 1999. Molecular basis of genetic variability in RNA viruses. In *Molecular biology of plant viruses*, pp. 121-141. C. L. Mandahar (Ed), Kluwer Academic Publishers, Norwell.

Burch, C. L. & Chao, L. 1999. Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus ϕ 6. Genetics 151:921-927.

Burnquist, W. L., & Vega J. 1996. Sugarcane diseases in southern Brazil: a brief report. In: Croft, B. J, Piggin, C. M., Wallis, E. S., Hogarth, D. M (eds). Sugarcane germplasm conservation and

exchange, ACIAR Proc No. 67. The Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp 59–61.

Caraux, G., Gascuel, O., Andrieu, G., & Levy, D. 1995. Approches informatiques de la reconstruction d'arbres phylogénétiques à partir de données moléculaires. *Tech. Sci. Info.* **14**:113-139.

Chaloub, B. A., & Lapierre, H. D. 1995. Importance des recombinaisons ARN dans l'évolution des lutéovirus. *Agronomie.* **15**:393-400.

Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irely, M., Lockhart, B. E. L., & Rott, P. 2001. Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. *Plant Dis.* **85**:1177-1180.

Chao, L. 1990. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature.* **348**:454-455.

Chay, C.A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A., & Gray, S. M. 1996b. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of Barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virol.* **219**:57-65.

Chriki, N., Rochdi, A., Nadif, A., Saumtally, S., & Ouhssine, M. 2003. Assainissement par culture d'apex : moyen de lutte curatif au niveau de la quarantaine contre la maladie de la feuille jaune (YLS) de la canne à sucre. *OEPP/EPPO Bulletin* **33**:351-354.

Clarke, D. K., Duarte, E. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. 1994. The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4821-4824.

Clayton, D. H. & Tompkins, D. M. 1994. Ectoparasite virulence is linked to mode of transmission. *Proc. R. Soc. Lond. B* **256**:211-217.

Comstock, J. C., Irvine, J. E. & Miller, J. D. 1994. Yellow leaf syndrome appears on the United States mainland. *Sugar J.* **56**:33-35.

Comstock, J. C., Irely, M. S., Lockhart, B. E. L., & Wang, Z. K. 1998. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane* **4**:21-24.

Comstock, J. C., Miller, J. D., Tai, P. Y. P., & Follis, J. E. 1999. Incidence of and resistance to sugarcane yellow leaf virus in Florida. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congress* **23**:366-372.

Comstock, J. C., Miller, J. D., & Schnell, R. J. 2001. Incidence of sugarcane yellow leaf virus in clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United States National Repository in Miami, Florida. *Sugar Tech* **3**(4):128-133.

Comstock, J. C., & Miller, J. D. 2004. Yield comparisons: Disease-free tissue-culture versus bud-propagated sugarcane plants and healthy versus yellow leaf infected plants. *J. American Soc. Sugar Cane Tech.* **24**:31-40.

Comstock, J.C., & Gilbert, R.A. 2005. Sugarcane yellow leaf disease. University of Florida Sugarcane Disease Handout. SS-AGR-256 P. 2-3.

Cronjé, C. P. R., Tymon, A. M., Jones, P., & Bailey, R. A. 1998. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. *Ann. Appl. Biol.* **133**:177–186.

Cronjé, C. P. R., & Bailey, R. A. 1999. Association of phytoplasmas with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol. Congress* **23**:373–381.

Crotty, S; Cameron, C.-E., & Andino R. 2001. RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:6895-6900

Daugrois, J. H., Boisne-Noc, R., & Rott, P. 2000. Testing sugarcane for resistance to *Sugarcane yellow leaf virus*. Page Ph-8 in: *Abstr. 6th Int. Soc. Sugar Cane Technol. Pathol. Workshop.*

D'Arcy, C. J., & Domier, L. L. 2005. *Luteoviridae*. Pages 891-900 in: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, eds. Elsevier Academic Press, London.

Daniels, J., & Roach, B. T. 1987. Taxonomy and evolution. In Heinz D.J. (Eds), 1987. *Sugarcane improvement through breeding.* Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp 7-84.

de la Peña, M., Elena, S. F. & Moya, A. 2000. Effect of deleterious mutation-accumulation on the fitness of RNA bacteriophage MS2. *Evolution* **54**:686-691.

Delage, C., Rippoles, M., Chatenet, M., Irely, M., & Rott, P. 1999. Elimination of sugarcane yellow leaf virus from sugarcane by meristem tip culture. In: Singh V, Kumar V, eds. *XXIII Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol. Congress*, (abstract). 404.

de Miranda, J. R., Stevens, M., de Bruyne, E., Smith, H. G., Bird, C. & Hull, R. 1995. Sequence comparison and classification of beet luteovirus isolates. *Arch. Virol.* **140**:2183–2200.

Dedryver, C.-A., Riault, G., Tanguy, S., Le Gallic, J. F., Trottet, M., & Jacquot, E. 2005. Intra-specific variation and inheritance of BYDV-PAV transmission in the aphid *Sitobion avenae*. *Eur. J. Plant Pathol.* **111**:341-354.

Demeler, S. A., Rucker-Feeney, D. G., Skaf, J. S., & De Zoleten, J A., 1996. Pea enation mosaic virus: properties and aphid transmission. In: *The Plant Viruses. Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite ARN Genomes.* Harrison, B. D., Murrant, A. F. eds., Plenum Press, New York, 303-344.

Desbiez, C., Wipf-Scheibel, C., Granier, F., Robaglia, C., Delaunay, T. & Lecoq, H. 1996. Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the Island of Martinique. *Plant Dis.* **80**:203-207.

Domingo E., & Holland J. J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Rev. Microbiol.* **51**:151-178.

Domingo, E., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Martín-Hernández, A. M., Sáiz, J. C., & Escarmís, C. 1998. Quasispecies Structure and Persistence of RNA Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:521-527.

Domingo, E. 2000. Viruses at the Edge of Adaptation. *Virol.* **270**:251-253.

Domingo, E. 2002. Quasispecies theory in virology. (Letter to the editor). *J. Virol.* **76**:463-465.

Drake J. W., 1993. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:4171-4175.

Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. & Crow, J. F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**:1667-1686.

Drake, J. W., & Holland. J. J., 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**(24):13910-13913.

Dutilleul, C., & Lainé, É. 2001. Mécanismes de résistance aux virus chez les plantes transgéniques - *Cahiers Agricultures*. **10**:105-119.

Ebert, D. 1998. Experimental evolution of parasites. *Science*. **282**:1432-1435.

Eigen, M. 1993. Les quasi-espèces virales. *Pour la Science*. **191**:36-45.

Eigen, M. 1996. On the nature of virus quasispecies: *Trends Microbiol.* **4**:216-218.

Elena, S. F., Miralles, R. & Moya, A. 1997. Frequency-dependent selection in a mammalian RNA virus. *Evolution*. **51**:984-987.

Elena, S. F., Moya, A. 1999. Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *J. Evol. Biol.* **12**:1078-1088.

Elena, S. F. 2002. Restrictions to RNA virus adaptation: an experimental approach. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:135-142.

Elena, S. F., & Lenski, R. E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Rev.* **4**:457-469.

Escarmís, C., Dávila, M., Charpentier, N., Bracho, A., Moya, A. & Domingo, E. 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J. Mol. Biol.* **264** :255-267.

Ewald, P. W. 1987. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **503**:295-306.

Faith, D. P. & Cranston, P. S. 1991. Could a cladogram this short have arisen by chance alone? On permutation tests for cladistic structure. *Cladistics*. **7**:1-28.

F.A.O. 2005. FAOSTAT database gateway. URL: <http://faostat.fao.org/>

Fahrasmane, L. ; Ganou-Parfait. B. 1997. De la canne au rhum. INRA.

Fauconnier, R. & Bassereau, D. 1970. La canne à sucre. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 468 p.

Feldmann, P., d'Hont, A., Guiderdoni, E., Grivet, L. & Glaszmann, J. C. 1997. La canne à sucre. P. 197-215 *in*: L'amélioration des plantes tropicales. A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon et D. Nicolas, ed. CIRAD et ORSTOM, Montpellier, France.

Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach *J. Mol. Evol.* **17**:368-376.

Fenner, F., Day, M. F. & Woodroffe, G. M. 1956. Epidemiological consequences of the mechanical transmission of myxomatosis by mosquitoes. *J. Hyg.-Cambridge* **54**:284-303.

Figlerowicz, M., Nagy, P. D. & Bujarski, J. J. 1997. A mutation in the putative RNA polymerase gene inhibits nonhomologous, but not homologous, genetic recombination in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:2073-2078.

Fitch, M. M. M., Lehrer, A. T., Komor, E. & Moore, P. H. 2001. Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Plant Pathol.* **50**:676-680.

Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.

Flynn, J., Powell, G., Perdomo, R., Montes, G., Quebedeaux, K., & Comstock, J. 2005. Comparison of sugarcane disease incidence and yield of field run, heat-treated, and tissue-cultured based seedcane. *J. American Soc. Sugar Cane Technol.* **25**:88-100.

Fontaniella, B., Vicente, C., Legaz, M. E., de Armas, R., Rodríguez, C. W., Martínez, M., Piñón, D., Acevedo, R. & Solas, M. T. 2003. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiol. Biochem.* **41**:1027-1036.

Fraile, A., Escriu, F., Aranda, M. A., Malpica, J. M., Gibbs, A. J. & García-Arenal, F. 1997. A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J. Virol.* **71**:8316-8320.

Froissart, R., Michalakakis, Y. & Blanc, S. 2002. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathol.* **92**:576-579.

Froissart, R., Wilke, C. O., Montville, R., Remold, S. K., Chao, L., & Turner, P. E. 2004. Co-infection Weakens Selection Against Epistatic Mutations in RNA Viruses. *Genetics* **168**:9-19.

Froissart, R., Roze, D., Uzest, M., Galibert, L., Blanc, S., & Michalakakis, Y. 2005. Recombination every day: Abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biol.* **3**:889-897.

Furió, V., Moya, A., Andrés., & Sanjuán, R. 2005. The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**:10233-10237.

García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**:157-186.

García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* **6**:225-232.

Garret, A., Kerlan, C. & Thomas, D. 1993. The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch. Virol.* **131**:377-392.

Gaur, R. K.; Rao, G. P.; Singh, M., & Lehrer, A. T. 2003. Sequence analysis of the entire RNA genome of sugarcane yellow leaf luteovirus of an Indian isolate. BSPP Presidential Meeting. (Abstract): (<http://www.bspp.org.uk/archives/bspp2003/bspp03phgregabstracts.htm>).

Gibbs, M. 1995. The luteovirus supergroup: rampant recombination and persistent partnerships. In *Molecular Basis of Virus Evolution*, pp. 351-368. A. J. Gibbs, C. H. Calisher et F. García-Arenal (Eds), Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Gildow F.E. 1999. Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In Smith, H. G., Barker, H. (Eds), 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, United Kingdom, pp 88-112.

Gildow, F. E. 1993. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathol.* **83**:270-277.

Gildow, F. E., & Gray, S. M. 1993. The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteoviruses. *Phytopathology* **83**:1293-1302.

Gonçalves, M.C., Klerks, M. M., Verbeek, M., Vega, J. & van-den Heuvel, J. F. J. M. 2002. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of *Sugarcane Yellow Leaf Virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* **108**:404-407.

Gonçalves, M. C., van-der-Wilk, F., Dulleman, A. M., Verbeek, M., Vega, J., & van-den-Heuvel, J. F. J. M. 2005a. Aphid transmission and *Buchnera* sp. GroEL affinity of a *Potato leafroll virus* RTD deficient mutant. *Fitopato. Bras.* **30**:259-266.

Gonçalves, M. C., Vega, J., Oliveira, J. G., & Gomes, M. A. 2005b. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitopatol. Bras.* **30**:10-16.

Gray, S. M., & Banerjee, N. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:128-148.

Gray, S., & Gildow, F. E. 2003. Luteovirus-aphid interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* **41**:539-566.

Grisham, M. P., Pan, Y.-B., Burner, D. M., Wei, Q., Flynn, J. L., Irely, M. S., & Lockhart, B. E. L. 1997. Presence of the yellow leaf syndrome virus in Louisiana sugarcane *J.Sugar y Azucar.* **92**:23.

Grisham, M. P., Pan, Y.-B., Legendre, B. E. L., Godshall, M. A., & Eggleston, G. 2001. Effect of sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* **24**:434-438.

Grivet, L., Daniels, C., Glaszmann, J. C., & D'Hont, A. 2004. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. *Ethnobotany Research and Applications.* **2**:9-17.

Guyader, S., & D. Giblot Ducray. 2002. Sequence analysis of *Potato leafroll virus* isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. *J. Gen. Virol.* **83**:1799-1807.

Guyader, S. 2003. Evaluation du potentiel de variabilité du *Potato leafroll virus* (*Luteoviridae*, *Polerovirus*) et identification de quelques facteurs de sélection. Thèse de doctorat, Université Rennes I, 126 p.

Guyader, S., & Giblot-Ducray, D. 2004. L'évolution des virus à ARN: rôles de la sélection et de la dérive génétique. *Virologie.* **8**:187-198.

Haigh, J. 1978. The accumulation of deleterious genes in a population — Muller's Ratchet. *Theor. Popul. Biol.* **14**:251-67

Hall, J. S., French, R., Hein, G. L., Morris, T. J. & Stenger, D. C. 2001. Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric wheat streak mosaic virus lineages. *Virol.* **282**: 230-236.

Harrison, B. D. 1984. Potato leafroll virus. No. 291 in: Descriptions of plant viruses. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Bio., Kew, England.

Harisson, B. D. 1999. Steps in the development of Luteovirology. Pages :1-14. In: The Luteoviridae (Smith, H., et Backer, H, eds.). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, England.

Harrington, R. 2002. BYDV: The heat is on. In Henry, M and McNab, A, eds. *Barley yellow dwarf disease*: Recent advances and future strategies. Mexico, DF: CIMMYT. 34-39.

Harrison, C. J., & Langdale, A. 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.* **45**:561-572.

Hauser. S., Stevens. M., Mougél. C, Smith, H. G., Fritsch, C., Herrbach, E., & Lemaire, O. 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape; *Phytopathol.* **90**:460-466.

Hay, A. J., Gregory, V., Douglas, A. R. & Lin, Y. P. 2001. Evolution of human influenza viruses. *Philoso. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci.* **356** :1861-1870.

Hébrard, E., Froissart, R., Louis, C., & Blanc, S. 1999. Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs *Virologie.* **3**:35-48.

Hebrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T., Uzest, M., Froissart, R., Strub, J.-M, Sanglier, S, van Dorsselaer, A., Padilla, A, Labesse, G, & Blanc, S. 2001. Biochemical Characterization of the Helper Component of *Cauliflower Mosaic Virus* *J. Virol.* **75** (18):8538-8546

Herre, E. A. 1993. Population structure and the evolution of virulence in nematode parasites of fig wasps. *Science* **259**:1442-1445.

Holmes, E. C. & Moya, A. 2002. Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? (Letter to the editor). *J. Virol.* **76**:460-462.

Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H., & Raccach, B. 1994. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* **75**:1407-1414.

Irey, M. S., Baucum, L. E., Derrick, K. S., Manjunath, K. L., & Lockhart, B. E. L., 1997. Detection of the luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane (YLS) by a reverse transcriptase polymerase chain reaction and incidence of YLS in commercial varieties in Florida. *Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol. 5th Pathology and 2nd Molecular Biology Workshop.*

Izaguirre-Mayoral, M. L., Carballo, O., Alceste, C., Romano, M., & Nass, H. A. 2002. Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcane in Venezuela. *J. Phytopathol.* **150**:13-19.

James, C. K. N., & Keith, L. P. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol. Plant Pathol.* **5**:505-511.

Jenkins, G. H., 1966. Introduction to cane sugar technology. Elsevier Publishing Co., New York. 478 pp.

Jolly, C. A., & Mayo, M. A. 1994. Changes in the amino acid sequences of the coat protein read through domain of potato leafroll luteovirus effect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**:182-185.

Jridi, C., Martin, J.-F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., & Blanc, S. 2006. Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. *J. Virol.* **80**:2349-2357.

Julien, M. H. R., Irvine, J. E. et Benda, G. T. A. 1989. Sugarcane anatomy, morphology and physiology. P. 1-20 *in*: Diseases of sugarcane: major diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. Gillaspie et C. G. Hughes, ed. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands.

Kamer, G. & Argos, P. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* **12**:7269-7282.

Kim, Y.-G., Maas, S., Wang, S. C. & Rich, A. 2000. Mutational study reveals that tertiary interactions are conserved in ribosomal frameshifting pseudoknots of two luteoviruses. *RNA* **6**:1157-1165.

Koonin, E. V., & Dolja, V. V. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**:375-430.

Korimbocus, J., Coates, D., Barker, I., & Boonham, N. 2002a. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* **103**:109-120.

Korimbocus, J., Preston, S., Danks, C., Barker, I., Coates, D., & Boonham N. 2002b. Production of monoclonal antibodies to sugarcane yellow leaf virus using recombinant readthrough protein. *J. Phytopathol.* **150**:488-494.

Legendre, P. 2000. Comparison of permutation methods for the partial correlation and partial Mantel tests. *J. Statistical Comput. Simulat.* **67**:37-73.

Lehrer, A. T., Schenck, S., Fitch, M. M. M., Moore, P. H., & Komor, E. 2001. Distribution and transmission of sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) in Hawaii and its elimination from seedcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* **24**:439-443.

Leigh-Brown, A. 1994. Methods of evolutionary analysis of viral sequences, In *The Evolutionary Biology of Viruses*, (Morse, S. S., ed.) Raven Press, Ltd., New York.

Leigh-Brown, A. J. 1997. Analysis of HIV-1 *env* gene sequences reveals evidence for a low effective number in the viral population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1862-1865.

Li, H & Roossinck, M. J. 2004. Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population. *J. Virol.* **78**:10582-10587.

Lockhart, B. E. L., & Cronjé, C. P. R. 2000. Yellow leaf syndrome. Pages 291-295 in: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft, and A. S. Saumtally, eds. La Librairie du Cirad, Montpellier.

Lockhart, B. E. L., Irely, M. S., & Comstock, J. C. 1996. Sugarcane bacilliform virus, sugarcane mild mosaic virus and sugarcane yellow leaf syndrome. Page 134 in: Sugarcane germplasm conservation and exchange, ACIAR Proceedings No 67. B. J. Croft, C. M. Piggan, E. S. Wallis, and D. M. Hoggart, eds. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

Luo G, Xin S, & Cai Z. 2003. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol.* **77**:3312-3318.

Lucio-Zavaleta, E., Smith, D. M., & Gray, S. M. 2001. Variation in transmission efficiency among *Barley yellow dwarf virus*-RMV isolates and clones of the normally inefficient aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. *Phytopathol.* **91**:792-796.

Mackinnon, M. J. & Read, A. F. 1999. Genetic relationships between parasite virulence and transmission in the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution.* **53**:689-703.

Mahy, B. W. J., 2001 A Dictionary of Virology. Academic Press, San Diego.

Maia, I. G., Gonçalves, M. C., Arruda, P., & Vega, J. 2000. Molecular evidence that sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. *Arch. Virol.* **145**: 1009-1019.

Malpica, J. M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C. I., Drake, J. W. & García-Arenal, F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics.* **162** :1505-1511.

Mangwende, T., Mirkov, T. E., & Albert H. H. 2005. The P0 protein of sugarcane yellow leaf virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Int. Plant & Animal Genomes XIII Conf. Proc.* Abstract A161, P38.

Martin, R. R., Keese, P. K., Young, M. J., Waterhouse, P. M., & Gerlach W. L. 1990. Evolution and molecular biology of luteoviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**:341-363.

Maruthi, M. N., Colvin, J., Seal, S., Gibson, G. & Cooper, J. 2002. Co-adaptation between cassava mosaic geminiviruses and their local vector populations. *Virus Res.* **86**:71-85.

Mastari, J. & Lapierre, H. 1999. Sequences of the 3' halves of the genomes of Barley Yellow Dwarf Virus-PAV cpA isolates that vary in symptom severity. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**:801-811

Masuta, C., Ueda, S., Suzuki, M. & Uyeda, I. 1998. Evolution of a quadripartite hybrid virus by interspecific exchange and recombination between replicase components of two related tripartite RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **18**:10487-10492.

Mathews, S. & Donoghue, M.J. 1999. The root of angiosperm phylogeny inferred from duplicate phytochrome genes. *Science.* **286**:947-950.

Matsuoka, S., & Meneghin, S. P. 1999. Yellow leaf syndrome and alleged pathogens: a causal but not a causal relationship. *Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol.* **23**:382-289.

Mayo, M. A., & Miller, W. A. 1999. The structure and expression of Luteovirus genomes. In: Smith HG, Barker H (ed) *The Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, pp 23-42.

Mayo, M. A., Robinson, D. J., Jolly, C. A. & Hyman, L. 1989. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA. *J. Gen. Virol.* **70** :1037-1051.

Mayo, M. A., & Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Adv. Virus Res.* **46**:413-460.

Mayo, M., Ryabov, E., Fraser, G., & Taliansky, M. 2000. Mechanical transmission of *potato leafroll virus*. *J. Gen. Virol.* **81**:2791-2795.

McGrath, P. F., Lister, R. M., and Hunter, B. G. 1996. A domain of the readthrough protein of *Barley yellow dwarf virus* (NY-RPV isolate) is essential for aphid transmission. *Eur. J. Plant Prot.* **102**:671-679

Miller, W. A., & Rosochová, L. 1997. Barley yellow dwarf viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:167-190.

Moonan, F., Molina, J., & Mirkov, T. E. 2000. *Sugarcane yellow leaf virus*: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. *Virol.* **269**:156-171.

Moonan, F., & Mirkov, T. E. 2002. Analyses of genotypic diversity among North, South, and Central American isolates of *Sugarcane yellow leaf virus*: Evidence for Colombian origins and for intraspecific spatial phylogenetic variation. *J. Virol.* **76**:1339-1348.

Moutia, J.-F. Y., & Saumtally, S. 2001. Diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in cane juice and the effect of hot water treatment on its control. *Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* **24**:444-450.

Moya, A., Rodríguez-Cerezo, E. & García-Arenal, F. 1993. Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Mol. Biol. Evol.* **10**:449-456.

Moya, A., Elena, S. F., Bracho, A., Miralles, R. & Barrio, E. 2000. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6967-6973.

Nagy, P. D. & Simon, A. E. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virol.* **235**:1-9.

Ng, J. C. K., Liu, S., & Perry, K. L. 2000. Cucumber mosaic virus mutants with altered physical properties and defective in aphid vector transmission. *Virol.* **276**:395-403.

Novella, I. S., Clarke, D. K., Quer, J., Duarte, E. A., Lee, C. H., Weaver, S. C., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. J. 1995a. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *J. Virol.* **69**:6805-6809.

Novella, I. S., Duarte, E. A., Elena, S. F., Moya, A., Domingo, E. & Holland, J. J. 1995b. Exponential increases of RNA virus fitness during large population transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:5841-5844.

Novella, I. S., Hershey, C. L., Escarmís, C., Domingo, E. & Holland, J. J. 1999. Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an arbovirus in insect and mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **287**:459-465.

Parmessur, Y., & Dookun, A. 2000. Response of sugarcane yellow leaf virus and sugarcane bacilliform virus to eradication by tissue culture. *Proc. Intl. Soc. Sugar Cane Technol.* **6th** Sugarcane

Pathol. Workshop, July 16–23 2000: P-15.

Pavesi, A., De Iaco, B., Granero, M. I. & Porati, A. 1997. On the informational content of overlapping genes in prokaryotic and eukaryotic viruses. *J. Mol. Evol.* **44**:625-631.

Pavesi, G. 2000. Detection of signature sequences in overlapping genes and prediction of a novel overlapping gene in hepatitis G virus. *J. Mol. Evol.* **50**:284-295.

Peiffer, M. L., Gildow, F. E., & Gray, S. M. 1997. Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J. Gen. Virol.* **78**:495-503.

Peng, Y.-H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., and Raccah, B. 1998. Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: Effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* **79**:897-904.

Perry, K. L. & Francki, R. I. 1992. Insect-mediated transmission of mixed and reassorted cucumovirus genomic RNAs. *J. Gen. Virol.* **73**:2105-2114.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* **76**:6815-6824.

Pirone, T. P. & Blanc, S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**:227-247

Posada, D., & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinfo.* **14**:817–818.

Purseglove, J. W., 1979. Tropical crops: monocotyledons. Longman Group Ltd., London. 607 pp.

Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P., & Ahlquist, P. 1993. Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1498-1502.

Rabenstein, F., Graichen, K., Proll, E., Herrbach, E., & Lemaire, O. 1995. Detection of a second distinct strain of beet western yellows luteovirus in oilseed rape using monoclonal antibodies. *Ber. Bundesanst. Züchtungsforsch. Kulturpflanzen* **1**:137-140.

Rassaby L., 2001. Le syndrome de la feuille jaune de la canne à sucre causé par le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) à La Réunion : caractérisation et impact. Thèse de Docteur en Sciences, spécialité Phytopathologie. Université de la Réunion, U.F.R. Sciences, 88 pages.

Rassaby, L., Girard, J. C., Irej, M. S., Lockhart, B. E. L., Kodja, H. & Rott, P. 2001. Yellow leaf syndrome in sugarcane cultivars of Réunion Island: Dynamics of SCYLV in the field and in the plant. *Proceedings International Society of Sugarcane Technologists Congress* **24**:451-455.

Rassaby, L., Girard, J.-C., Letourmy, P., Chaume, J., Irej, M. S., Lockhart, B. E. L., Kodja, H., & Rott, P. 2003. Impact of *Sugarcane yellow leaf virus* on sugarcane yield and juice quality in Réunion Island. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**:459-466.

Rassaby, L., Girard, J.-C., Lemaire, O., Costet, L., Irej, M. S., Kodja, H., Lockhart, B. E. L., & Rott, P. 2004. Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the Island of Réunion. *Plant Pathol.* **53**:117-125.

Rathjen, J. P., Karageorgos, L. E., Habili, N., Waterhouse, P. M. & Symons, R. H. 1994. Soybean dwarf luteovirus contains the third variant genome type in the luteovirus group. *Viol.* **198**:671-679.

Rhodes, T., Wargo, H., & Hu, W.-S. 2003. High Rates of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombination: Near-Random Segregation of Markers One Kilobase Apart in One Round of Viral Replication. *J. Virol.* **77**:11193-11200.

Ricaud, C. & Ryan, C. C. 1989. Leaf scald. P. 39 -53 *in*: Diseases of sugarcane: major diseases. C. Ricaud, B. T. Egan, A. G. J. Gillaspie et C. G. Hughes, ed. Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands.

Robbins, M. A., Reade, R. D. & Rochon, D. M. 1997. A cucumber necrosis virus variant deficient in fungal transmissibility contains an altered coat protein shell domain. *Viol.* **234**:138-146.

Robert, Y. 1999. Epidemiology of potato leafroll disease. In *The Luteoviridae*, pp. 221-229. Smith H. G. et Baker, H.(Eds), CAB International, Wallingford.

Robert, Y. & Bourdin, D. 2001. Transmission of Viruses. In *Virus and virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes*, pp. 195-225. G. Loebenstein, P. H. Berger, A. A. Brunt & Lawson R. H. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Robert, Y. & Lemaire, O. 1999. Epidemiology and control strategies. In *The Luteoviridae* , pp. 211-279. Edited by H. G. Smith & H. Baker. Wallingford:CABI.

Rochow, W. F. 1977. Dependent virus transmission from mixed infections. In Harris, K. F., Maramorosch, K., 1977. Aphids as virus vectors. Academic Press (Eds), New-York, USA, pp 253-273.

Roossinck, M. J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**:191-209.

Rott, P., Bailey, R. A., Comstock, J. C., Croft, B. J., Saumtally, A. S. 2000. A guide to sugarcane diseases. La Librairie du Cirad (Eds), Montpellier, France, 339 pages.

Rott, P., Comstock, J. C., Croft, B. J., Kusalwong, A., & Saumtally, S. 2005. Advances and challenges in sugarcane pathology: A review of the 2003 pathology workshop. *Proc. Intl. Soc. Sugarcane Technol. Congress* **25**:607-614.

Robert, Y. & Rouzé-Jouan, J. 1971. Premières observations sur le rôle de la température au moment de la transmission de l'Enroulement par *Aulacorthum solani* Kltb., *Macrosiphum euphorbiae* Thomas et *Myzus persicae* Sulz. *Potato Res.* **14**:154-157.

Rouzé-Jouan, J., Terradot, L., Pasquer, F., Tanguy, S. & Giblot Ducray-Bourdin, D. 2001. The passage of *Potato leafroll virus* through *Myzus persicae* gut membrane regulates transmission efficiency. *J. Gen. Virol.* **82**:17-23.

Rutherford, R. S. 2006. SCYLV: implications for a plant breeding programme. VIIIth Intl. Soc. Sugar Cane. Technol. Pathology Workshop Petit-Bourg, Guadeloupe (FWI) 23-27 January.

Sacristán, S., Malpica, J. M., Fraile, A., & García-Arenal, F. 2003. Estimation of population bottlenecks during systemic movement of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. *J. Virol.* **77**:9906-9911.

Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagórski-Ostoja, W., Gronenborn, B. & Hulanicka, M. D. 2001. The ORF0 product of *Potato leafroll virus* is indispensable for virus accumulation. *J. Gen. Virol.* **82**:1529-1532.

Saitou, N., & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

Sanfaçon, H. 2005. Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Can. J. Bot.* **83**:1529-1549.

Sanjuan, R., Moya, A. & Elena, S. F. 2004a. The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**:15376-15379.

Sanjuan, R., Moya, A. & Elena, S. F. 2004b. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**:8396-8401.

Sasaki, N., Fujita, Y., Mise, K. & Furusawa, I. 2001. Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid Bromovirus are required for adaptation to a nonhost. *Virol.* **279**:47-57.

Scagliusi, S. M., & Lockhart, B. E. L. 2000. Transmission, characterization, and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. *Phytopatho.* **90**:120-124.

Scagluisi, S. M., & Lockhart, B. E. L. 1997. Transmission, characterisation and serology of sugarcane yellow leaf luteovirus. In: *Proc. Intl. Soc. Sugarcane Technol. Pathology and Molecular Biology Workshop*, 3-11 May 1997, Durban, South Africa.

Schenck, S., Hu, J. S., & Lockhart, B. E. L. 1997. Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. *Sugar Cane* **4**:5-8.

Schenck, S., & Lehrer, A. T. 2000. Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. *Plant Dis.* **84**:1085-1088.

Schenck, S. 2001. Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts. Pages 25-35 in: *Sugarcane pathology volume II: Virus and phytoplasma diseases*. G. P. Rao, R. E. Ford, M. Tasic, and D. S. Teakle, eds. Science Publishers Inc, Enfield, NH.

Schneider, W. L. & Roossinck, M. J. 2000. Evolutionarily related Sindbis-like plant viruses maintain different levels of population diversity in a common host. *J. Virol.* **74**:3130-3134.

Schneider, W. L. & Roossinck, M. J. 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virol.* **75**:6566-6571.

Schuppli, D., Georgijevic, J. & Weber, H. 2000. Synergism of mutations in bacteriophage Q β RNA affecting host factor dependence of Q β replicase. *J. Mol. Biol.* **295**:149-154.

Shen, R., & Miller, W. A. 2004. The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley yellow dwarf virus-like cap-independent translation element. *J. Virol.* **78**:4655-4664.

Simmons, M. P., Bailey, D. C. & Nixon, K. C. 2000. Phylogeny reconstruction using duplicate genes. *Mol. Biol. Evol.* **17**:469-473.

Simmonds, P., & Smith, D. B. 1999. Structural constraints on RNA virus evolution. *J. Virol.* **73**:5787-5794.

Smith, H. G., Barker, I., Brewer, G., Stevens, M., & Hallsworth P. B. 1996. Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of beet mild yellowing luteovirus and related strains. *Eur. J. Plant Path.* **102**:163-169.

Smith, H. G., & Barker, H. 1999. The *Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon

Smith, G. R., Borg, Z., Lockhart, B. E. L., Braithwaite, K. S., & Gibbs, M. J. 2000. Sugarcane yellow leaf virus: a novel member of the *Luteoviridae* that probably arose by inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* **81**:1865-1869.

Solé, R. V., Ferrer, R., González-García, I., Quer J. & Domingo E. 1999. Red queen dynamics, competition and critical points in a model of RNA virus quasispecies. *J. Theor. Biol.* **198**:47-59.

Soopramanien, G. C. 2000. Sugarcane morphology, anatomy and physiology. P. 13-20 in: A guide to sugarcane diseases. P. Rott, R. A. Bailey, J. C. Comstock, B. J. Croft & A. S. Saumtally, ed. CIRAD and ISSCT, Montpellier, France.

Stevens, M., Freeman, B., Liu, H.-Y., Herrbach & Lemaire, O. 2005. Beet poleroviruses: close friends or distant relatives?. *Mol. Plant. Pathol.* **6** (1):1-9.

Taliansky, M., Mayo, M. A. & Barker, H. 2003. *Potato leafroll virus*: a classic pathogen shows some new tricks. *Mol. Plant Pathol.* **4**:81-89.

Tamada, T., Harrison, B. D. & Roberts, I. M.(1984). Variation among British isolates of potato leafroll virus. *Ann. Appl. Biol.* **104**:107-116.

Terauchi, H., Kanematsu, S., Honda, K., Mikoshiba, Y., Ishiguro, K., & Hidaka S. 2001. Comparison of complete nucleotide sequences of genomic RNAs of four Soybean dwarf virus strains that differ in their vector specificity and symptom production. *Arch. Virol.* **146**:1885-1898.

Terradot, L., Souchet, M., Tran, V., & Giblot D.-B, D. 2001. Analysis of a three-dimensional structure of *Potato leafroll virus* coat protein obtained by homology modeling. *Virol.* **286**:72-82.

Teycheney, P. Y. 1999. Plantes et virus: La guerre Sans fin. *Biofutur* 189. Mai:30-33.

Torrance, L., Pead, M. T., Larkins, A. P., & Butcher, G. W. 1986. Characterisation of monoclonal antibodies to a UK isolate of barley yellow dwarf virus. *J. Gen. Virol.* **67**:549-556.

van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M. & Peters, D. 1993. The relationship between aphid-transmissibility of potato leafroll virus and surface epitopes of the viral capsid. *Phytopathol.* **83**:1125-1129.

van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M. & van der Wilk, F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **75**:2559-2565.

van Den Heuvel, J. F. J. M., Bruyere, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., and Richards, K. 1997. The N-terminal region of the luteovirus

readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* **71**:7258-7265

van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H., & Goldbach, R. 1997. Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:153-159.

van Dillewijn, C. 1960. Botanique de la canne à sucre. Hoveenman et Zonen N. V., Amsterdam, Netherlands, 321 p.

van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. Wickner, R. B. 2000. (Eds) *Virus Taxonomy: the Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, CA.

van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evol. Theory* **1**:1-30.

Vega, J., Scagliusi, S. M. M., & Ulian, E. C. 1997. Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: Evidence of association with a luteovirus. *Plant Dis.* **81**:21-26.

Victoria, J. I., Avellaneda, M. C., Angel, J. C., & Guzmán, M. L. 2005. Resistance to *Sugarcane yellow leaf virus* in Colombia. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol. Congr.* **25**:664-670.

Viswanathan, R. 2002. Sugarcane yellow leaf syndrome in India: Incidence and effect on yield parameters. *Sugar Cane Int.* **20**:17-23.

Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:14147-14152.

Wang, J. Y., Chay, C., Gildow, F. E. & Gray, S. M. 1995. Readthrough Protein Associated with Virions of Barley Yellow Dwarf Luteovirus and Its Potential Role in Regulating the Efficiency of Aphid Transmission. *Virol.* **206**: 954-962.

Wang, S., K. S. Browning, & W. A. Miller. 1997. A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO. J.* **16**:4107-4116.

Wang, M.-L., Schenck, S., & Albert, H. 2005. Antibody to a short peptide sequence detected sugarcane yellow leaf virus isolates from several sources. *Sugarcane Int.* **23**:25-27.

Wilke, C. O. 2005. Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evolutionary Biology* **5**:44.

White, K. A. & Morris, T. J. 1994. Nonhomologous RNA recombination in Tombusviruses: generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. Virol.* **68**:14-24.

White, P. S., Morales, F. J., & Roossinck, M. J. 1995. Interspecific reassortment in the evolution of a cucumovirus. *Virol.* **207**:334-337.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**:1101-1115.

Woroby, M. & Holmes, E.C. 1999 Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. General Virol.* **80**:2535–2543.

Wu, B., & White, K. A. 1999. A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *J. Virol.* **73**:8982-8988.

Yang, Z. 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood *CABIOS* **13**:555-556.

Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N. & Krabbe Pedersen, A.-M. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* **155**:431-449.

Yi, M., & Lemon, S. M. 2003. Structure–function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA.* **9**:331-45.

Yuste E, Sánchez-Palomino S, Casado C, Domingo E, & López-Galíndez C. 1999. Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. *J Virol.* **73**:2745-2751.

Ziegler-Graff, V., Braul, V., Mutterer, J. D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E., & Jonard, G. 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**:501–510.

Résumé

Le *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) est un *Polerovirus* de la famille des *Luteoviridae* et l'agent causal de la feuille jaune, une maladie émergente de la canne à sucre. Quatre génotypes du SCYLV (BRA pour Brésil, CUB pour Cuba, PER pour Pérou et REU pour Réunion) ont été identifiés grâce à l'analyse phylogénétique du génome de 14 isolats viraux originaires du Brésil, de Chine, de Colombie, de Cuba, de Floride, d'Inde et de La Réunion. Des amorces spécifiques ont été dessinées pour différencier par RT-PCR ces génotypes et un fragment unique a été amplifié à partir de chacun d'entre eux, à l'exception des génotypes BRA et PER qui sont assez proches et qui ont été désignés génotype BRA-PER. Le génotypage par RT-PCR de 245 isolats viraux originaires de 18 pays producteurs de canne à sucre a permis de montrer que le génotype BRA-PER est largement répandu dans le monde. En revanche, les génotypes CUB et REU ont été trouvés dans seulement quatre pays chacun. La co-existence des génotypes BRA-PER, CUB et REU en Guadeloupe révèle la transmission locale de ces trois génotypes par le puceron vecteur *Melanaphis sacchari*. Néanmoins, la présence quasi exclusive du génotype BRA-PER au Brésil et du génotype REU à La Réunion suggère aussi l'existence de fortes interactions entre les génotypes du SCYLV et leur environnement, et donc des évolutions différentes de ce virus. Le pourcentage de diversité élevé des isolats du génotype CUB par rapport aux isolats des autres génotypes nous a conduit à proposer leur reclassement au sein d'une nouvelle espèce, le *Sugarcane yellow leaf Cuba virus* (SCYLCV). L'histoire évolutive du SCYLV a pu être retracée par des études phylogénétiques, par la mise en évidence de remaniements génomiques (recombinaisons, délétions, insertions) propres à certains isolats, de différentiels de pressions sélectives sur les ORFs et de codons sélectionnés positivement. L'existence de plusieurs souches virales au sein du SCYLV a été démontrée grâce à l'inoculation de huit variétés de canne à sucre avec les génotypes BRA-PER, CUB et REU via *M. sacchari*, ainsi que la comparaison du comportement de deux variétés de canne à sucre naturellement infectées par les génotypes BRA-PER et REU. L'origine génétique de ces variations de pathogénie reste à être élucidée.

Mots clés : Diversité, évolution, génotype, *Luteoviridae*, nouvelle espèce, pathogénie, *Polerovirus*, RT-PCR, SCYLV, virulence.

Genetic diversity and variability in pathogenicity of *Sugarcane yellow leaf virus*, the causal agent of yellow leaf of sugarcane

Abstract

Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) is a *Polerovirus* of the family *Luteoviridae* and the causal agent of yellow leaf, an emerging disease of sugarcane. Four genotypes of SCYLV (BRA for Brazil, CUB for Cuba, PER for Peru and REU for Réunion) were identified by phylogenetic analyses of the genome of 14 virus isolates from Brazil, China, Colombia, Cuba, Florida, India and Réunion Island. Specific primers were designed to differentiate these genotypes by RT-PCR, and a unique fragment was amplified from each, with the exception of genotypes BRA and PER which are phylogenetically close and which were named genotype BRA-PER. Genotyping by RT-PCR of 245 virus isolates from 18 sugarcane production areas showed that genotype BRA-PER is widespread in the world. In contrast, genotypes CUB and REU were found in only four locations each. In Guadeloupe, the coexistence of genotypes BRA-PER, CUB and REU revealed local transmission of these three genotypes by the aphid vector *Melanaphis sacchari*. However, nearly exclusive presence of genotype BRA-PER in Brazil and genotype REU in Réunion Island also suggested the existence of strong interactions between SCYLV genotypes and their environment, and therefore different evolution events within this virus. The high percentage of diversity between genotype CUB isolates and isolates of the other genotypes led us to propose the reclassification of CUB isolates within a new species called *Sugarcane yellow leaf Cuba virus* (SCYLCV). The evolution history of SCYLV was traced by phylogenetic studies and analysis of evolutionary events in the viral genome (recombinations, deletions, insertions) specific to some isolates, and detection of selective pressures on ORFs and positive selection of codons. The occurrence of several strains of SCYLV was demonstrated by inoculation of eight sugarcane varieties with genotypes BRA-PER, CUB and REU via *M. sacchari*, as well as comparison of virus populations and growth characteristics of two sugarcane varieties naturally infected by genotypes BRA-PER and REU. The genetic origin of these variations in pathogenicity remains to be elucidated.

Key words: Diversity, evolution, genotype, *Luteoviridae*, new species, pathogenicity, *Polerovirus*, RT-PCR, SCYLV, virulence.

Discipline: Biology of organisms.

Unité Mixte de Recherche Agro.M/CIRAD/INRA, Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI), TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5.